

U. PORTO



INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS ABEL SALAZAR
UNIVERSIDADE DO PORTO



IPO PORTO

INSTITUTO PORTUGUÊS DE ONCOLOGIA DO PORTO, FG EPE

CARACTERIZAÇÃO DO VÍRUS DE EPSTEIN-BARR (EBV) EM DOENTES COM CARCINOMA GÁSTRICO

João Miguel Amaro da Silva

Dissertação de Mestrado em Oncologia

2010

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS ABEL SALAZAR DA UNIVERSIDADE DO PORTO

**Caracterização do Vírus de Epstein-Barr (EBV) em doentes com
carcinoma gástrico**

João Miguel Amaro da Silva

Orientador: Professor Doutor Mário Dinis Ribeiro,
Professor Auxiliar Convidado da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto

Co-orientador: Mestre Hugo Manuel Lopes de Sousa,
Aluno Doutoramento Ciências Biomédicas UP

Dissertação de Candidatura ao grau de Mestre em Oncologia submetida ao
Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar da Universidade do Porto

AGRADECIMENTOS

Agradeço às seguintes pessoas que, com as suas valiosas contribuições (directas e indirectas), fizeram com que esta dissertação fosse possível.

Ao Professor Doutor Mário Dinis, meu orientador, agradeço todo o seu apoio e pela objectividade, ferramentas e metodologias investigacionais ensinadas que me fizeram crescer/desenvolver os meus conhecimentos, sentido crítico e postura em relação à investigação.

Ao Mestre Hugo Sousa, que acompanhou a minha ainda curta vida na investigação, agradeço a sua ajuda, paciência, incentivo e motivação durante esta longa caminhada, bem como pela partilha da sua sabedoria e confiança que depositou em mim.

Ao Professor Doutor Rui Medeiros agradeço por o seu contínuo incentivo e estímulo para fazermos parte do mundo científico, bem como, por confiar e deixar-me entrar no mundo de investigação de oncologia molecular que me levou até este ponto.

Agradeço à Mestre Ana Pinto Correia pela sua disponibilidade e ajuda prestada, que tornou possível a conclusão do estudo.

Ao Serviço de Virologia do IPO - Porto, particularmente à Dr.^a Inês Baldaque e à Dr.^a Albina Marinho, agradeço a ajuda prestada na detecção serológica do EBV.

Ao Ministério da Saúde cujo patrocínio tornou este estudo possível.

A todos os meus colegas do Grupo de Oncologia Molecular pela entreaajuda e pelo empenhamento nos trabalhos diários que tornam possível a realização dos projectos científicos.

Ao Dr. Luís Azevedo, grande amigo e colega, que me acompanhou nos primeiros passos na investigação e neste projecto, agradeço o companheirismo e boa disposição que permitiu um excelente trabalho de equipa que por consequência possibilitou a realização de parte deste projecto.

À Empresa Eurotrials – Consultores Científicos agradeço pelo apoio e pelas facilidades que me disponibilizaram para a realização deste projecto.

À minha família agradeço pelo apoio e pelos valores que sempre me transmitiram e que me levaram ao culminar do que sou e aonde estou. Destaco especialmente com um grande agradecimento: a minha Mãe pelo apoio, amor e paciência incondicionais e pelo estímulo contínuo de cada dia ser mais e melhor naquilo que faço; ao meu Pai pelo apoio, amor e paciência incondicionais e pelo sentido crítico realista e de responsabilidade que incute; e à minha 'Mana' pela ajuda, amor e paciência incondicionais e pelas frequentes 'discussões' que me fizeram e fazem levar o dia-a-dia com um sorriso nos lábios.

À minha Super – Hiper – Namorada ‘SL’ quero dar um grande agradecimento por estar sempre disposta a ajudar, por fazer parte da minha vida, pela grande paciência, amor, dedicação, motivação contínua, felicidade, iluminação e risos que me dá em cada dia (9 toques).

ÍNDICE

RESUMO	XI
ABSTRACT	XII
I. INTRODUÇÃO	1
1. CANCRO.....	3
2. VÍRUS E CANCRO	5
2.1 <i>Vírus de Epstein-Barr (EBV)</i>	6
2.2 <i>Ciclo de Vida do EBV</i>	8
2.2.1 Fases latentes do EBV	9
2.2.2 Fase lítica do EBV	11
2.3 <i>EBV e Cancro</i>	11
3. EBV E CANCRO GÁSTRICO.....	12
3.1 <i>Cancro Gástrico</i>	12
3.2 <i>EBV no Cancro Gástrico</i>	14
II. OBJECTIVOS	17
III. MATERIAL	21
1. TIPO DE ESTUDO	23
2. POPULAÇÃO	23
3. AMOSTRAGEM	23
3.1 <i>Doentes com Lesões e/ou carcinoma gástrico</i>	23
3.2 <i>Indivíduos saudáveis</i>	23
IV. MÉTODOS	25
1. PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS	27
2. EXTRACÇÃO DNA	27
3. DETECÇÃO MOLECULAR DO EBV	28
4. DETECÇÃO SEROLÓGICA DO EBV	29
4.1 <i>DETECÇÃO EBV IGG ANTI-VCA E EBV IGM ANTI-VCA (ELISA)</i>	29
4.2 <i>DETECÇÃO DE EBV IGG ANTI-EA E EBV ANTI-EBNA (IFA)</i>	29
5. VARIÁVEIS	31
6. ANÁLISE ESTATÍSTICA	32
V. RESULTADOS	33
1. CARACTERIZAÇÃO DA FREQUÊNCIA DE EBV	35
1.1 <i>EBV EM INDIVÍDUOS SAUDÁVEIS</i>	35

1.2	<i>EBV EM DOENTES COM LESÕES E/OU ADENOCARCINOMA GÁSTRICO</i>	35
2.	ANÁLISE DA INFECÇÃO POR EBV EM DOENTES COM ADENOCARCINOMA GÁSTRICO DO TIPO INTESTINAL.....	37
2.1	<i>Caracterização da infecção por EBV</i>	37
2.2	<i>Caracterização da Presença de EBV circulante</i>	37
2.3	<i>Análise da sobrevida e tempo até progressão associada a EBV</i>	39
VI.	DISCUSSÃO	41
VII.	CONCLUSÃO	45
VIII.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURAS

Figura 1 - Eventos ocorridos durante a carcinogénese dividida em etapas: Iniciação, Promoção e Progressão, que poderão estar separadas por meses ou até mesmo anos.....	4
Figura 2 - Genoma do Vírus Epstein-Barr.....	7
Figura 3 - Principais eventos nas diferentes fases da infecção do EBV.....	9
Figura 4 - Caminho proposto por <i>Correa</i> dos eventos patológicos no adenocarcinoma gástrico.....	13
Figura 5 - Carcinoma gástrico associado ao EBV - Possível sequência de eventos na mucosa.....	16
Figura 6 - Detecção dos produtos da região <i>BAM H1W</i> do EBV através de um <i>Nested-PCR</i> : M, Marcador de 100bp; (+), controlo positivo; (-), controlo negativo; 1 e 2, casos EBV negativo; 3 a 5, casos EBV positivo (280 pb).....	28
Figura 7 - Resultado positivo para EBV IgG Anti-EA por IFA.....	30
Figura 8 - Resultado positivo para EBV Anti-EBNA por IFA.....	30
Figura 9 - Frequência dos tipos de infecção por EBV	37
Figura 10 - Tempo médio de sobrevida global (A) e até progressão (B).....	40

TABELAS

Tabela 1 - Padrões de latência do EBV	10
Tabela 2 - Caracterização das malignidades associadas ao EBV*	12
Tabela 3 - Caracterização dos doentes com lesões e/ou Carcinoma Gástrico...	23
Tabela 4 - Caracterização dos indivíduos saudáveis	23
Tabela 5 - Quadro resumo da classificação serológica da infecção por EBV	31
Tabela 6 - Frequência de EBV nos indivíduos saudáveis	35
Tabela 7 - Frequência de EBV nos doentes com lesões e/ou adenocarcinoma gástrico	36
Tabela 8 - Análise estatística da presença do EBV entre os diferentes tipos histológicos	36
Tabela 9 - Presença de EBV em função do tipo de infecção	37
Tabela 10 - Presença de EBV em função da classificação TNM e estadio clínico	38
Tabela 11 - Tempo médio de sobrevida global e até progressão em função da presença de EBV	39



. RESUMO/ABSTRACT



RESUMO

Apesar da falta de informação sobre o papel do Vírus de Epstein-Barr (EBV) na carcinogénese dos adenocarcinomas gástricos (CG), um dos maiores problemas de saúde pública, é sugerido que este representa um evento tardio no processo de carcinogénese.

Novas provas continuam a emergir, contudo, a associação do EBV na carcinogénese gástrica está ainda pouco estabelecida. Mais estudos serão ainda necessários com o objectivo de caracterizar melhor esta associação e, consequentemente, dar resposta a todas as dúvidas.

Os objectivos deste estudo foram a caracterização molecular da presença de EBV em circulação em doentes diagnosticados com lesões e/ou carcinoma gástrico, a sua comparação com indivíduos saudáveis e a caracterização molecular e serológica do EBV em doentes com adenocarcinoma gástrico de tipo intestinal.

Foram analisadas amostras de plasma/soro correspondentes a trezentos e cinco (305) indivíduos sem qualquer patologia oncológica e cento e cinquenta e quatro (154) doentes com lesões e/ou carcinoma gástrico, dos quais quarenta e nove (49) estavam diagnosticados com adenocarcinoma gástrico de tipo intestinal.

Recorreu-se à técnica de *Nested*-PCR para a detecção molecular do EBV e utilizaram-se as técnicas ELISA e IFA para a identificação serológica do tipo de infecção por EBV.

Apesar das limitações inerentes ao estudo foi demonstrado um vasto conjunto de dados que devem ser considerados para estudos futuros e que demonstram grande importância na área: frequência de EBV circulante em 32% da população saudável, principalmente em indivíduos do sexo masculino; frequência de EBV circulante em doentes com lesões e/ou CG: 35% nos ALGA, 39% no tipo difuso e 45% no tipo intestinal; 65,3 % dos doentes com CG tipo intestinal tem reactivação da infecção por EBV; os doentes com CG tipo intestinal e com a avaliação da envolvimento nodular N3 apresentaram um risco de presença de EBV oito vezes maior que os doentes com as avaliações da envolvimento nodular N012; e associação, apesar de não estatisticamente significativa, com menor sobrevivência global e menor tempo até à progressão.

O estudo desempenhou uma parte fulcral na caracterização inicial e na definição da estratégia para obter melhores resultados num projecto maior, em desenvolvimento, que visa a caracterização completa do EBV no CG e, assim, ajudar a responder a dúvidas que ainda permanecem sobre o papel do EBV na carcinogénese do CG.

ABSTRACT

Despite the lack of information about the role of the Epstein-Barr Virus (EBV) in Gastric Adenocarcinomas (GC), one of the major public health problems worldwide, it is suggested that it can represent a late event on carcinogenesis process.

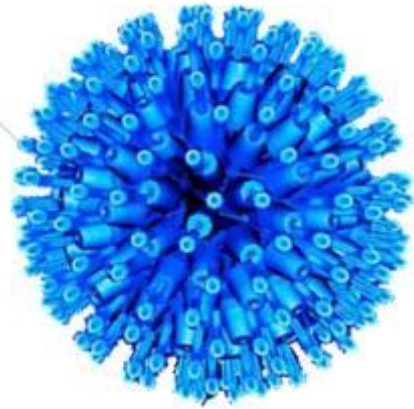
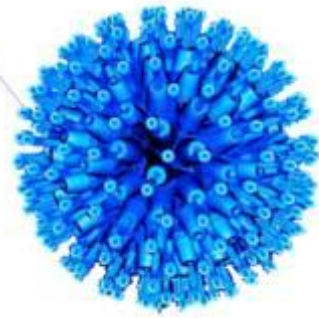
New evidences continue to emerge, although the association of EBV in gastric carcinogenesis is still poorly understood, more studies are still needed in order to better characterize this association and therefore give answers to all these questions. The aims of this study were the molecular characterization of the EBV circulatory presence in patients diagnosed with lesions and / or gastric carcinoma and its comparison with healthy subjects, and the serological and molecular characterization of EBV in patients with gastric adenocarcinoma of intestinal type.

Plasma/serum samples were analyzed corresponding to three hundred and five (305) subjects without any oncological pathology and hundred and fifty four (154) patients with lesions and/or gastric carcinoma, of which forty nine (49) were diagnosed with gastric adenocarcinoma of intestinal type.

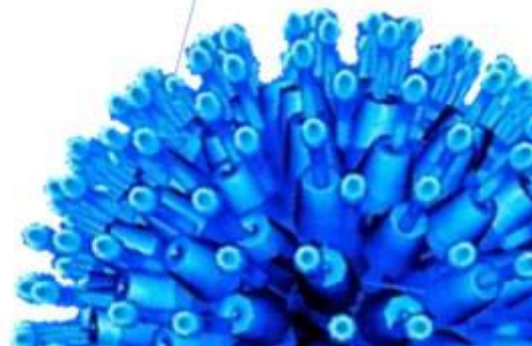
For molecular detection of EBV the technique *Nested-PCR* was used and the techniques ELISA and IFA were used for the serological identification of the type of EBV infection.

Regardless the limitations of the study, a wide range of data was demonstrated that should be considered for future studies and shows great importance for the area: the frequency of circulating EBV in 32% of the healthy population, mostly males; the frequency of circulating EBV in patients with lesions and/or GC: 35% in ALGA, 39% in diffuse type and 45% in intestinal type; 65.3% of patients with GC intestinal type have reactivation of EBV infection; patients with GC intestinal type and with an evaluation of nodular surroundings N3 had a risk of EBV presence 8 times higher than patients with evaluations of nodular surroundings N012; association, although not statistically significant, with shorter overall survival and shorter time until progression.

The study played a key part in the initial characterization and definition of a strategy for getting the best results on a wider project, still in development, aiming for a complete characterization of EBV in GC and thus helping answer the questions that remain about the role of EBV in the carcinogenesis of GC.



I. INTRODUÇÃO



1. CANCRO

Ocupando o segundo lugar nas causas de morte em Portugal e no Mundo, o cancro tem reunido imensos esforços no sentido de compreender o seu desenvolvimento, identificar indivíduos com maior propensão para cancro e desenvolver novas terapêuticas (Ferlay J *et al*, 2004). Desde as evidências pré-históricas, aos primeiros relatos de Hipócrates até à actualidade, o cancro tem vindo a assumir-se como um grave problema de saúde pública.

Actualmente, a sociedade contemporânea assiste a uma alteração epidemiológica associada a alterações ambientais e alterações das características genéticas que ocorreram ao longo da história (Capasso, 2005). O cancro é considerado uma doença de etiologia multifactorial, desencadeada pela interacção de factores carcinogénicos (ambientais, físicos e químicos), factores comportamentais e factores de predisposição genética que conferem uma vantagem proliferativa às células alteradas (DeVita *et al*, 2001).

A transformação de uma célula normal em célula maligna é um processo progressivo e demorado, cerca de cinco a vinte anos (Liotta e Liu, 2001). A alteração, desencadeada por mutações e/ou pela desregulação genética, de apenas um gene não é auto-suficiente para o progresso cancerígeno. A progressão para a malignidade está dependente de outras modificações, onde a selecção e organização clonal estabelecem a dinâmica da carcinogénese (Michor *et al*, 2004). Esta lenta transformação genética de células normais em células neoplásicas inclui vários passos: iniciação, promoção e progressão (Figura 1) (Pitot HC *et al*, 1981).

O processo de desenvolvimento cancerígeno dá-se quando o passo da iniciação é activado por uma alteração no material genético da célula por acção de um agente carcinogénico que conduza a uma mutação não letal. As células *iniciadas* adquirem um novo fenótipo e novas características que, em alguns casos, vão começar a reorganizar-se, levando à promoção cancerígena. A promoção, fase mais longa do processo de formação neoplásica, consiste em uma acumulação de defeitos genéticos que promovem selectivamente a célula *iniciada* conferindo-lhe vantagem relativamente às restantes células do meio envolvente, tornando-se biologicamente autónoma, dependendo do hospedeiro apenas para obtenção de oxigénio e nutrientes (Duarte GIS 2005, Vogelstein *et al.*, 1998).

Por fim, inicia-se a progressão que compreende a expansão clonal das variantes celulares que sofreram o processo de transformação e cujas características genéticas são mais favoráveis à contínua proliferação celular que leva, em última instância, ao desenvolvimento de cancro (Duarte GIS 2005, Lewin, 2004).

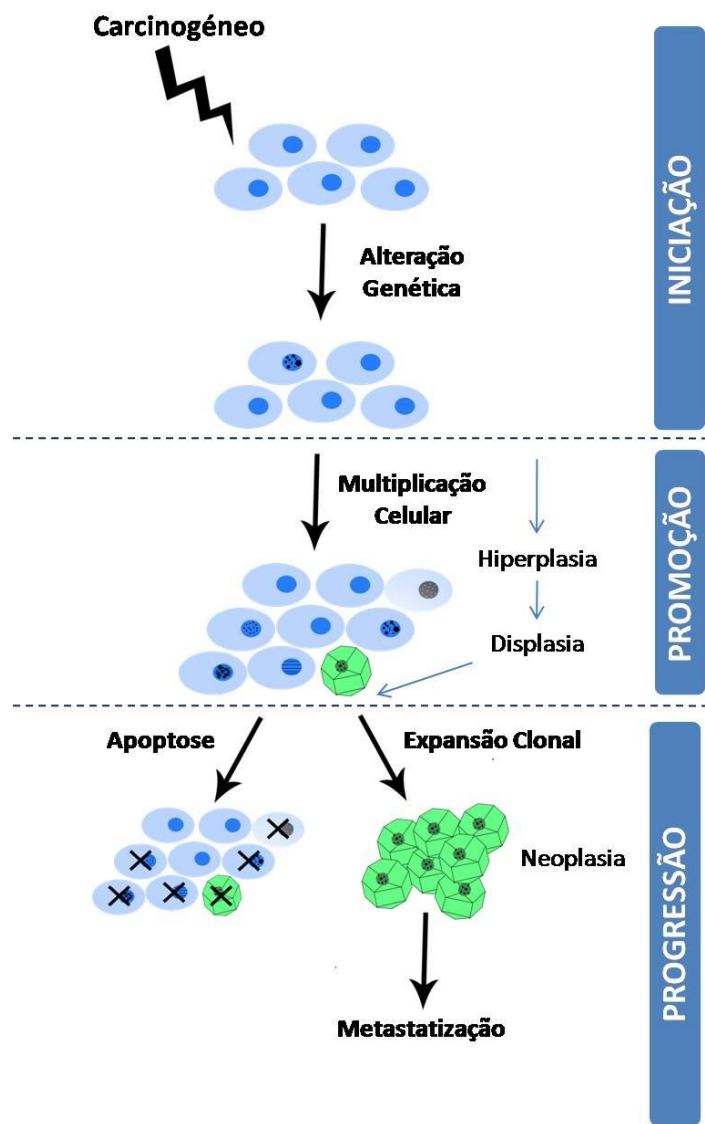


Figura 1 - Eventos ocorridos durante a carcinogênese dividida em etapas: Iniciação, Promoção e Progressão, que poderão estar separadas por meses ou até mesmo anos.

2. VÍRUS E CANCRO

Em todo mundo, as infecções por microorganismos são uma das mais importantes causas de cancro. É estimado que 17.8%, aproximadamente 1,9 milhões, de casos da incidência mundial do cancro, do ano 2002, fossem atribuídos a infecções induzidas ou por bactérias ou por vírus (Parking DM *et al*, 2006; Catherine de Martel e Silvia Franceschi, 2009).

Há muito que é atribuído a vírus e bactérias um papel no desenvolvimento cancerígeno. Nos passados vinte anos, as investigações em curso têm continuamente alargado o nosso conhecimento sobre o papel oncogénico dos agentes infecciosos. Estudos em animais e humanos têm extensamente sugerido um papel carcinogénico de vários patogénios (Selgrad, M. *et al*, 2008).

Aos vírus em particular tem sido atribuído um importante papel no processo de tumorogénese envolvendo vários órgãos. Em 1911 é descrita a primeira evidência de associação de um vírus na carcinogénese, quando Rous descobre sarcomas em galinhas e a sua etiologia, o Vírus do Sarcoma de Rous (RSV) (Rous, 1991). Nos anos subsequentes, vários estudos demonstraram a presença de vírus em alguns tumores humanos, mas nunca eram considerados como a sua etiologia principal. A primeira prova de associação viral na carcinogénese humana deu-se, no início dos anos 60, com a descoberta do Vírus *Epstein-Barr* (EBV) em biopsias de Linfoma de Burkitt (Burkitt, 1958; Epstein *et al*, 1964). Posteriormente, outros estudos demonstraram a associação de outros vírus na carcinogénese humana, como os vírus da Hepatite B e C no carcinoma hepatocelular em 1979 (Hantz *et al*, 1979) ou como, em 1993, o Vírus do Papiloma Humano no cancro do colo do útero (Schiffman *et al*, 1993).

Na actualidade, os cancros associados a vírus representam 16% de todos os casos de cancro humano (Farrell, 2002).

Características como a habilidade de inibir uma resposta imune e como o controlo do ciclo celular, pertencentes à maior parte dos vírus, são responsáveis por incutir modificações fenotípicas nas células que, conseqüentemente, levam à expansão clonal e ao desenvolvimento de cancro. Interações das proteínas virais com a célula do hospedeiro são obrigatórias para que haja desenvolvimento cancerígeno. Porém, na maioria dos casos uma condição de imunossupressão do hospedeiro tem de estar estabelecida para que esse desenvolvimento proceda.

2.1 VÍRUS DE *EPSTEIN-BARR* (EBV)

Em 1958, Denis Burkitt descreve um cancro comum que afectava principalmente crianças em regiões, endémicas de malária, da África equatorial. Devido à distribuição climática e geográfica dos casos, Burkitt acreditava que um vector viral pudesse ser o responsável pelo seu desenvolvimento. Seis anos mais tarde, em 1964, o grupo de Anthony Epstein identifica pela primeira vez o Vírus *Epstein-Barr* (EBV), quando através de um microscópio electrónico conseguiu identificar partículas virais em uma linha celular estabelecida a partir de uma biópsia de linfoma de Burkitt. Posteriormente, foi descoberto que o soro de pacientes com o linfoma, que Burkitt descreveu, tinha maior número de anticorpos para o EBV do que os controlos sem linfoma. A subsequente detecção de DNA de EBV no linfoma de Burkitt e a produção experimental de linfomas em animais, estabeleceram o EBV como o primeiro vírus envolvido no desenvolvimento de um tumor humano.

O EBV é um *gammaherpesvirus* do género *lymphocryptovirus* e, como os outros herpesvírus, é um vírus de envelope de cadeia dupla de DNA protegido com uma nucleocápside icosaédrica de 100 nm de diâmetro composta por 162 capsómeros. Por conter na sua superfície os receptores glicoproteicos que vão interagir com as células, o seu envelope é de extrema importância para o processo de infecção (Murray e Young, 2001; Rickinson e Kieff, 2001; Lopes *et al*, 2003; Young e Murray, 2003; Thompson e Kurzrock, 2004).

O genoma do EBV consiste em uma cadeia dupla de DNA com 184 000 pb que codifica mais de 85 genes (Kieff E. *et al*, 2001). O DNA do EBV permanece, geralmente, em múltiplas cópias episomais circulares no núcleo da célula hospedeira e replica-se em sincronização com os cromossomas celulares (Liebowitz, 1995; Klein, 1998). Muito esporadicamente o DNA pode integrar o DNA celular, mas este facto é muito raro e não é específico (Liebowitz, 1995).

Estão descritos dois genótipos de EBV que infectam o ser humano, o EBV-1 e o EBV-2, distinguidos principalmente com base na organização dos genes que codificam os antígenos nucleares do EBV, os EBNA (Young *et al*, 1987; Sample *et al*, 1990, Baumforth *et al*, 1999). O EBV-2 é bastante menos ubíquo na população humana, sendo mais prevalente em regiões Africanas, enquanto que o EBV-1 pode ser encontrado em qualquer população. Apesar da distribuição dos dois genótipos ser distinta ainda não foi demonstrada qualquer ligação com o desenvolvimento específico de uma doença (Jenkins e Farrell, 1996; Baumforth *et al*, 1999).

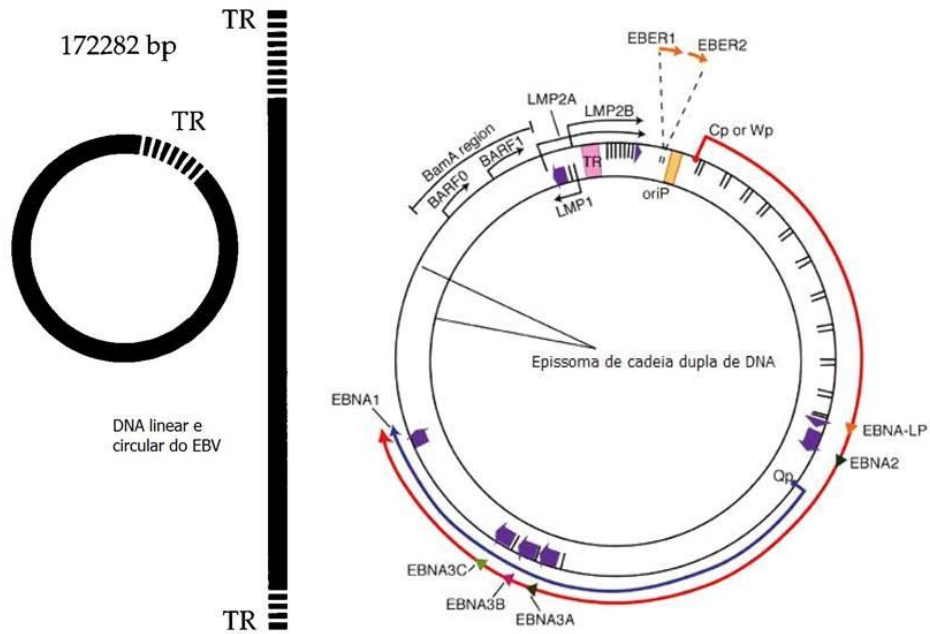


Figura 2 - Genoma do Vírus Epstein-Barr

Estrutura circular e linear do EBV com os terminais de repetição (TR), a origem da replicação plasmídica (OriP) e os genes de latência da cadeia dupla de DNA: antígenos nucleares (EBNA1, 2, 3A, 3B, 3C e -LP); proteínas membranares de latência (LMP1, 2A e 2B); moléculas pequenas de RNA EBER1 e EBER2; e transcriptos *BamH1* (BARF0, 1).

Adaptado de *Klein* (1998) e *Young e Rickinson* (2004)

2.2 CICLO DE VIDA DO EBV

O EBV é transmitido quase exclusivamente pela saliva. A primeira infecção ocorre geralmente nos primeiros anos de vida sendo os familiares os responsáveis pela transmissão. Em países desenvolvidos esta pode ser protelada até à adolescência ou fase adulta. Nestes casos poderá ser desenvolvida uma resposta imune, conhecida clinicamente como mononucleose infecciosa (Henle *et al*, 1968, Ohga *et al*, 2002; Levitsky e Masucci, 2002). Após controlada, a infecção fica assintomática devido ao estabelecimento do EBV num estado latente dentro dos linfócitos B de memória (Kuppers, 2003).

O EBV estabelece uma infecção persistente para toda a vida, na maior parte das vezes sem consequências, em mais de 90% da população mundial (Lopes *et al*, 2003; Young e Murray, 2003, Diane Sitki-Green *et al*, 2003). Em semelhança aos outros herpesvírus, o EBV possui duas fases durante o seu ciclo de vida: fase latente e fase lítica, porém, o seu mecanismo de infecção detalhado ainda não está integralmente descrito.

Pensa-se que a infecção primária ocorre no epitélio da orofaringe. Aqui, devido à interacção da glicoproteína viral membranar gp85/42 com o receptor de superfície celular específico MHC Classe II, o EBV infecta as células linfoepiteliais do anel de Waldeyer. Posteriormente, o EBV inicia um curto período de replicação lítica, após o qual é libertado para saliva e infecta células epiteliais adjacentes. Durante a infecção primária três anticorpos (-IgG, -IgM e -IgA) são produzidos contra o antígeno da cápside do EBV. Dois (-IgG e -IgA) são produzidos em resposta ao antígeno primário D e um outro (-IgG) é produzido em resposta ao antígeno primário R (Linde A. *et al*, 1996).

Num segundo período, infecta linfócitos B imaturos que estão nas proximidades, processo apenas possível devido à ligação da glicoproteína membranar do EBV gp350/220 com a molécula CD21 dos linfócitos B (Faulkner *et al*, 2000; Thompson e Kurzrock, 2004). Os linfócitos B infectados, agora células linfoblastoides com EBV latente (latência III), proliferam sem controlo. Muitas destas células proliferativas são eliminadas por uma resposta dos linfócitos T citotóxicos. No entanto, algumas escapam através da regulação negativa da expressão antigénica e pelo estabelecimento de um reservatório estável de linfócitos B de memória onde a expressão antigénica viral é quase inexistente (latência 0) (Kuppers, 2003; Young e Rickinson, 2004).

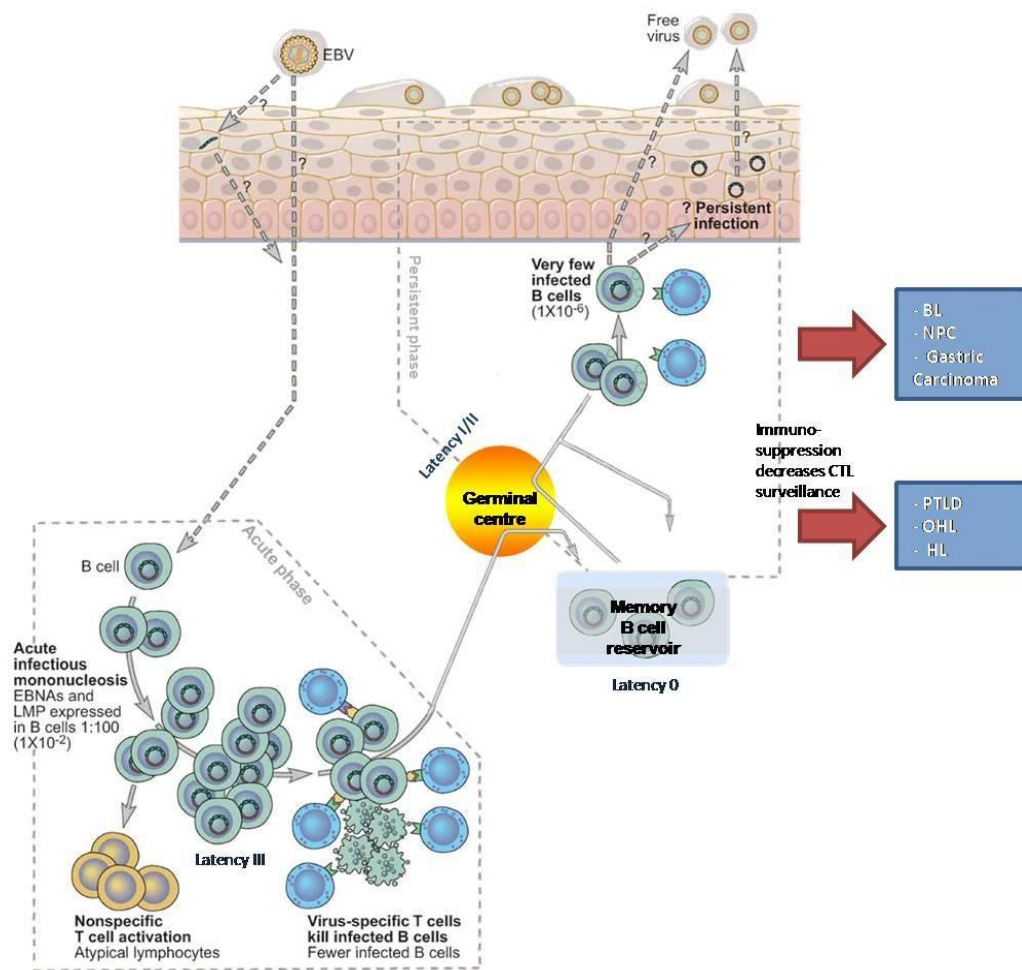


Figura 3 - Principais eventos nas diferentes fases da infecção do EBV

Adaptado de Kutok e Wang (2006) e Young e Rickinson (2004)

2.2.1 Fases latentes do EBV

Apenas a expressão de onze genes do EBV, de todos os amplamente conhecidos, foi demonstrada numa linha celular linfoblastoide: seis antígenos nucleares (EBNA1, 2, 3A, 3B, 3C e -LP), três proteínas membranares de latência (LMP1, 2A e 2B) e duas moléculas pequenas de RNA (EBER1 e 2). Destes genes, foi comprovado que apenas o EBNA1, 3A, 3C e -LP são essenciais para a imortalização da célula, enquanto que os EBNA2 e LMP1 são indispensáveis para o processo de transformação (Young *et al*, 2000; Rickinson e Kieff, 2001; Young e Rickinson, 2004). Ao desempenharem o papel de regulação do comportamento normal da célula, são estas proteínas específicas ao ciclo de latência que poderão vir a implicar o desenvolvimento de neoplasias às quais está associado o EBV (Rickinson e Kieff, 2001; Young e Rickinson, 2004).

No processo de imortalização, o EBV revela quatro padrões de expressão de proteínas virais: latência 0, latência I, latência II e latência III (Tabela I). À excepção do

padrão latência 0, padrão em que está suspensa qualquer expressão proteica, o antígeno nuclear EBNA1 é a única proteína viral expressa em todos os padrões.

Logo após a infecção dos linfócitos B o EBV expressa um completo conjunto de proteínas virais. Este padrão de expressão, a se que atribui a designação latência III, vai transformar os linfócitos B em blastos proliferativos caracterizados por um contínuo crescimento e por uma forma grande e irregular. Devido à activação dos promotores virais, promotor Wp e, posteriormente, o promotor Cp, são expressos na latência III todos os seis antígenos nucleares (EBNA1, 2, 3A, 3B, 3C e -LP), três proteínas membranares de latência (LMP1, 2A e 2B) e duas moléculas pequenas de RNA (EBER1 e 2).

Aquando da fase de expansão clonar, alguns dos linfócitos B infectados poderão atingir um centro germinativo, aqui, dependendo das células envolvidas, dois padrões distintos poderão ser expressados, a latência I/II. O programa de latência I, característico das células de linfoma de Burkitt, apenas expressa o EBNA1 e os EBER, enquanto que o programa de latência II, característico de carcinoma da nasofaringe e da doença de Hodgkin, expressa as mesmas moléculas mas também os LMP.

Tabela 1- Padrões de latência do EBV

Programa de latência	Genes expressos
0	EBERs
	(LMP2A)
I	EBNA-1
	EBERs
	BARF0
II	EBNA-1
	EBERs
	LMP-1
	LMP-2
	BARF0
III	Todos os EBNAs
	EBERs
	LMP-1
	LMP-2
	BARF0

* adaptado de *Thompson e Kurzrock (2004)* e *Kutok e Wang (2006)*

2.2.2 Fase lítica do EBV

O EBV, após a infecção primária, estabelece uma infecção latente persistente para toda a vida, na maior parte das vezes sem consequências. Porém, por causas ainda pouco esclarecidas, o vírus pode reactivar e reiniciar novamente a sua fase lítica (Kuppers, 2003). Apesar de pouco compreendida, pensa-se que factores específicos genéticos ou ambientais ou alterações imunológicas possam influenciar esta reactivação do EBV. Uma das provas existentes é que as neoplasias associadas ao EBV, patologias que sucedem a uma reactivação do vírus, surgem frequentemente após condição de imunossupressão do hospedeiro, como em indivíduos infectados com VIH ou malária (Lopes *et al*, 2003; Thompson e Kurzrock, 2004).

Está descrito que indutores fisiológicos regulares de replicação viral, como o receptor de célula B (BCR) e algumas citocinas, parecem influenciar a reactivação viral (Binne *et al*, 2002). A iniciação da replicação lítica é dependente do gene lítico *immediate-early* (BZLF1) do EBV, uma vez que este se junta ao *oriLyt* e medeia a mudança entre as formas líticas e latentes da infecção do EBV.

2.3 EBV E CANCRO

Desde a descoberta como o primeiro vírus humano a ser relacionado a uma neoplasia, o EBV tem sido implicado no desenvolvimento de vários cancros. Actualmente, está ligado ao desenvolvimento de neoplasias como o linfoma Burkitt Africano, a doença Hodgkin, a doença linfoproliferativa pós-transplante, o linfoma imunoblástico em indivíduos imunossuprimidos, o carcinoma indiferenciado da nasofaringe, o linfopitelioma gástrico e a casos raros de linfoma das células T (Klein, 1998; Young *et al*, 2000; Thompson e Kurzrock, 2004).

Também no cancro gástrico e no cancro da mama existem estudos que evidenciam que o EBV poderá ter um papel no seu desenvolvimento. Porém, a importância do papel do EBV na carcinogénese destas duas neoplasias é controverso e ainda está por ser inteiramente confirmado. Apesar de haver positividade do EBV em alguns achados histológicos destas neoplasias, ainda está para ser explicado o processo de entrada do vírus nas células, uma vez que as células destas neoplasias não possuem receptores específicos para o EBV; persiste, assim, uma lacuna na compreensão da importância do EBV no seu desenvolvimento e como este interage com as suas células (Rickinson e Kieff, 2001; Kuppers, 2003; Callan, 2004; Pagano *et al*, 2004; Thompson e Kurzrock, 2004; J.L. Kutok e F.Wang, 2006).

Tabela 2 - Caracterização das malignidades associadas ao EBV*

Malignancy	Subtype	EBV gene expression pattern	% EBV positivity
Burkitt's lymphoma	Endemic	Latency I	>95%
	Nonendemic		15–30%
Hodgkin's disease	MC	Latency II	70%
	LD		>95%
	NS		10–40%
	LP		<5%
Non-Hodgkin's lymphoma	Nasal T/NK	Latency II	>90%
	Angioimmunoblastic	Latency II	Unknown
	Lymphadenopathy		
Nasopharyngeal carcinoma	Anaplastic	Latency II	>95%
Breast Cancer	Medullary carcinoma	Not clear	0–51%
	Adenocarcinoma		
Gastric Cancer	Lymphoepithelioma-like	Controversial novel LMP-1 negative	>90%
	Adenocarcinoma	Latency III	5–25%
Posttransplant lymphoproliferative disorders		Latency III	>90%
AIDS-associated lymphomas	IP-CNS	Latency III	>95%
	Other		30–50%
Leiomyosarcomas in immunosuppressed individuals	Leiomyosarcomas varies	Unclear	Frequent

* Thompson e Kurzrock (2004)

3. EBV E CANCRO GÁSTRICO

3.1 CANCRO GÁSTRICO

Apesar do declínio da incidência durante o século XX, o cancro gástrico, mundialmente, continua o quarto cancro mais diagnosticado e o segundo mais mortal (Parkin DM *et al*, 2005). A maioria dos países asiáticos, do oeste da América do Sul e alguns países da Europa, como Portugal, são os locais com a mais alta incidência de cancro gástrico (Globocan, 2002).

Os tumores gástricos são classificados anatomicamente em proximais, também conhecidos por da cárdia, e como distais (mais frequentes), também conhecido por não-cárdia (J.G. Fox e C.W. Timothy, 2007). Histologicamente, os adenocarcinomas gástricos são normalmente classificados de acordo com a classificação de *Lauren* em bem diferenciados/intestinais e em indiferenciados/difusos (Lauren, 1965). Os tumores de tipo intestinal estão associados com atrofia, metaplasia intestinal e com gastrite corpus dominante. Por outro lado, o tipo difuso tipicamente ocorre com pangastrite sem atrofia, ou forma-se dentro de uma mucosa gástrica normal não inflamada. Os tumores de tipo difuso são encontrados uniformemente por todo o mundo, enquanto os tumores de tipo intestinal são encontrados predominantemente em áreas geográficas com alta incidência de cancro gástrico.

Pouco se sabe sobre as alterações histológicas que ocorrem durante a progressão para o cancro gástrico do tipo difuso. Já em relação à progressão para o cancro gástrico do tipo intestinal, sabe-se que esta envolve uma série de passos, conhecidos como o “*Caminho de Correa*”. Este mecanismo (Figura 4) indica que a infecção crónica por *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) progride durante décadas por uma ordem de estágios: gastrite crónica, atrofia, metaplasia intestinal, displasia e por fim

cancro, sendo o desenvolvimento de atrofia reconhecido como o passo crítico (Fox J.G. e Timothy C.W., 2007).

Apesar da forte associação entre a infecção por *H. pylori* com o cancro gástrico apenas 0,1 a 0.5% dos indivíduos infectados desenvolvem cancro gástrico. Estes valores vêm demonstrar que a infecção por *H. pylori*, por si só, não é suficiente para a indução do cancro gástrico. Portanto, outros factores como a susceptibilidade genética do hospedeiro, factores ambientais permissivos, diferentes determinantes de virulência da *H. pylori*, bem como factores ainda desconhecidos, poderão desempenhar um papel na carcinogénese gástrica (Selgrad, M. *et al*, 2008). No entanto, o *H. pylori* assume um papel fundamental no carcinoma gástrico, uma vez que induz inflamação gástrica em todos os indivíduos infectados que eventualmente, dependendo da susceptibilidade de cada um, poderá progredir para atrofia, metaplasia, displasia e, finalmente, cancro (Peek e Blaser, 2002).

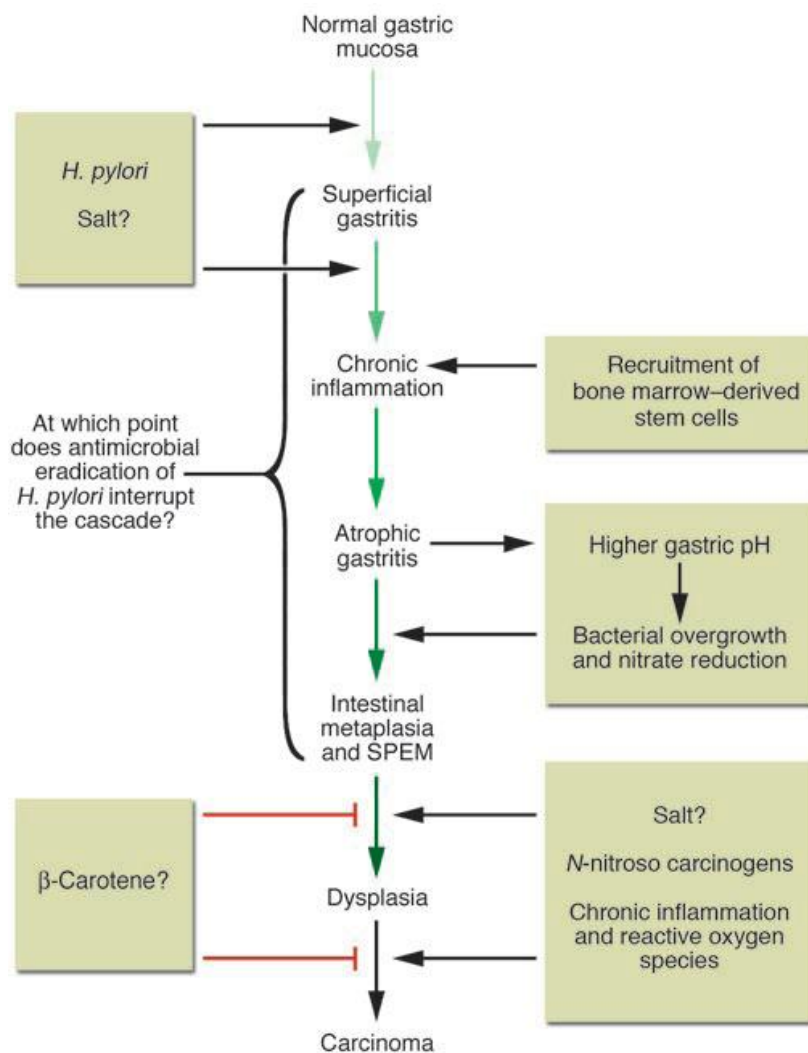


Figura 4 - Caminho proposto por Correa dos eventos patológicos no adenocarcinoma gástrico [Fox e Timothy (2007)]

3.2 EBV NO CANCRO GÁSTRICO

Além da *H. pylori*, outro agente infeccioso tem sido considerado como interveniente no cancro gástrico: o EBV. Este está associado a um subgrupo distinto de carcinoma gástrico que constitui perto de 10% de todos os casos de carcinoma gástrico (Fukayama M *et al*, 2008). O EBV é associado, no cancro gástrico, a dois tipos histológicos: ao raro linfóepitelioma gástrico e aos típicos adenocarcinomas gástricos.

Os carcinomas gástricos associados ao EBV (EBVaCG) atingem predominantemente os homens, de idade relativamente jovem, o antro do estômago e estão frequentemente associados a tumores pobremente diferenciados e a bom prognóstico (Selgrad, M. *et al*, 2008; Maeda E *et al*, 2008). A presença do EBV, nos EBVaCG, pode variar em mais de 90%, para os linfóepiteliomas gástricos, e entre 5 a 25% nos adenocarcinomas gástricos (Thompson e Kurzrock, 2004; Sousa H *et al*, 2008). Devido às similaridades morfológicas entre o linfóepitelioma gástrico e o carcinoma indiferenciado da nasofaringe, admite-se a hipótese de no linfóepitelioma gástrico, o EBV se espalhe da nasofaringe até ao estômago (Oda K., 1993). Em relação, ao adenocarcinoma gástrico é sugerido, devido à falta de receptores específicos ao EBV no epitélio gástrico, que a entrada do EBV se faça através de outro receptor que não o CD21 ou através da ligação de partículas virais, provenientes de linfócitos B, à IgA, sendo esta depois recolhida pelas células gástricas (Thompson e Kurzrock, 2004).

Durante a última década, o papel do EBV na carcinogénese gástrica tem vindo a ser reconhecido à medida que novas provas continuam a emergir. Apesar deste reconhecimento, ainda existe controvérsia de qual o momento em que o EBV infecta o epitélio gástrico: antes ou depois do desenvolvimento de carcinoma invasivo? Esta dúvida existe, uma vez que o EBV está presente em quase todas as células neoplásicas de todos os casos de EBVaGC e está ausente nos linfócitos circundantes, epitélio displásico e mucosa gástrica normal (Shibata D e Weiss LM, 1992; Maeda E *et al*, 2008).

Apesar da especulação à volta do mecanismo relacionado com o EBV e a tumorigénese das malignidades gástricas, está demonstrado que existe um atraso na apoptose nos carcinomas gástricos positivos para EBV, associado à sobreexpressão de BCL-2 e p53, e um decréscimo na diferenciação celular, associado com a subexpressão da caderina-E (Wu MS *et al*, 2000; Thompson e Kurzrock, 2004). À luz do que está demonstrado na actualidade, apresenta-se como a hipótese mais lógica o EBV desempenhar um evento tardio na carcinogénese gástrica, após a infecção por *H. pylori* (Hausen AZ *et al*, 2004, Sousa H *et al*, 2008).

Os EBVaGC albergam distintas aberrações cromossomais e são caracterizados por um padrão único de transcrição que tem parecenças mas não é idêntico ao do padrão

do carcinoma da nasofaringe (Uozaki H e Fukayama M, 2008). Os tumores dos EBVaGC são caracterizados por a ausência de expressão dos oncogenes mais comuns do EBV, exprimindo os genes: EBNA1, EBER, LMP2A, BART e BARF1 (Young LS e Rickinson AB, 2004).

De entre os estudos para comprovar quais as moléculas virais que poderão desempenhar um papel carcinogénese dos EBVaGC, foi comprovado que os micro RNA (miRNA) virais codificados pelo gene BART, que se verificou que também são expressados nos EBVaGC, poderão ter um papel importante no ciclo celular viral. Uma vez que estes, dependendo das condições, suportam a proliferação celular ou suprimem a apoptose e ainda podem ter a função de supressor tumoral ou oncogene (Kim *et al*, 2007; Bartel, 2004). Recentemente, foi demonstrado que o gene LMP2A desempenha um papel importante na resistência à apoptose, uma vez, que induz a expressão de um gene inibidor da apoptose, o *survivin* (Fukayama M *et al*, 2008) (Figura 4). Foi ainda observado um decréscimo de expressão nos genes p16INK4A, p73 e caderina-E, relacionado com a metilação aberrante das suas regiões promotoras. Estas evidências, juntamente com a comprovação da metilação do genoma viral e ausência de anormalidades genéticas, sugerem que a hipermetilação direccionada pelo EBV poderá desempenhar um papel primário na génese dos EBVaGC (Uozaki H e Fukayama M, 2008).

No seguimento destas descobertas, no ano 2008, os cientistas Masashi Fukayama, Rumi Hino e Hiroshi Uozaki propuseram um modelo de uma possível sequência de eventos dentro da mucosa, desde da infecção do EBV até ao desenvolvimento de carcinoma. A possível sequência de eventos dentro da mucosa consiste na infecção do EBV de certas células estaminais gástricas, expressão de genes latentes virais, anormalidade dos caminhos de sinais causa pelo gene LMP2A, metilação de DNA que provoca a repressão de genes supressores tumorais, crescimento do clone predominante e interacção com outros factores etiológicos (Fukayama M *et al*, 2008).

Apesar de estarem associados a bom prognóstico, existe uma lacuna na definição de indicadores de prognóstico e, ao contrário do que acontece no EBVaCG, em pacientes com carcinoma da nasofaringe a quantificação do DNA do EBV é considerada um bom indicador pois, nesta neoplasia, a elevada quantidade DNA viral está associada ao aumento de risco de desenvolvimento de metástases e reduzida taxa de sobrevivência. Apesar de novas provas continuarem a emergir, a associação do EBV na carcinogénese gástrica está ainda pouco estabelecida. Mais estudos serão necessários com o objectivo de caracterizar melhor esta associação e consequentemente dar respostas a todas as dúvidas.

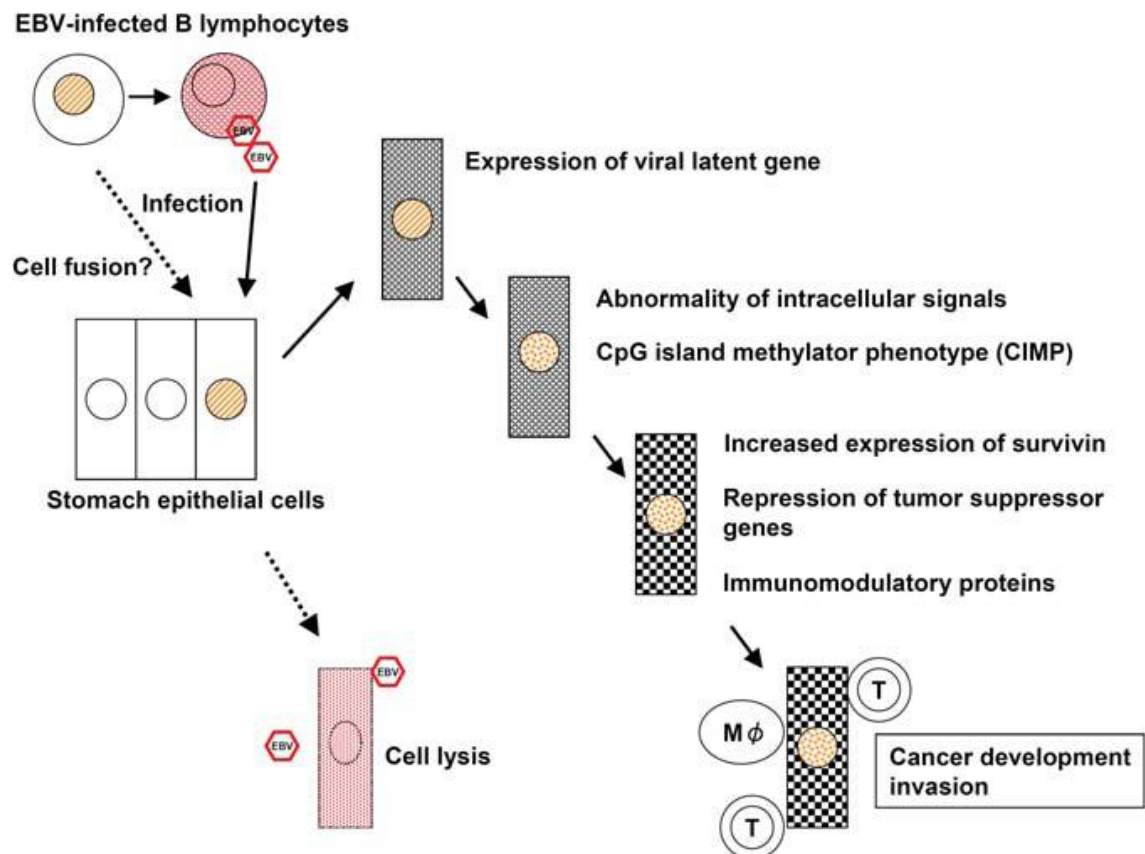
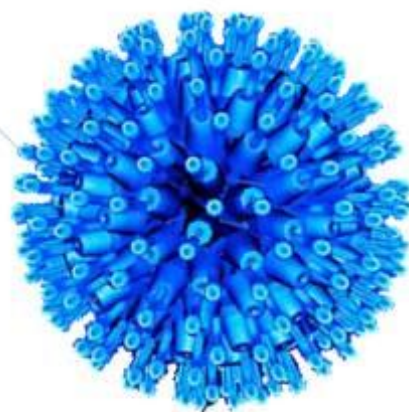
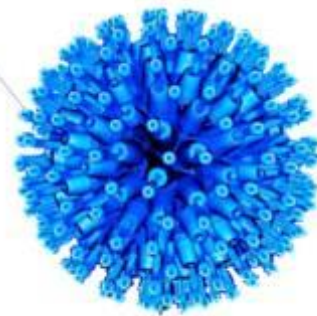


Figura 5 - Carcinoma gástrico associado ao EBV - Possível sequência de eventos na mucosa [Uozaki e Fukayama (2008)]

II. OBJETIVOS



Foram objectivos deste trabalho:

- Caracterizar molecularmente a presença de EBV em circulação em doentes diagnosticados com lesões e/ou carcinoma gástrico.
- Caracterizar molecular e serologicamente a presença de EBV em doentes diagnosticados com adenocarcinoma gástrico de tipo intestinal.
- Comparar a presença molecular de EBV entre doentes diagnosticados com lesões e/ou carcinoma gástrico com indivíduos saudáveis.



III. MATERIAL

1. TIPO DE ESTUDO

Estudo observacional descritivo retrospectivo.

2. POPULAÇÃO

A população em estudo é composta por: indivíduos saudáveis dadores de sangue no Instituto Português de Oncologia do Porto (IPO Porto) e doentes diagnosticados com lesões e/ou carcinoma gástrico seguidos no Serviço de Gastrenterologia do IPO Porto. Todos os indivíduos deram o seu consentimento informado de acordo com a *Declaração de Helsínquia*.

3. AMOSTRAGEM

3.1 DOENTES COM LESÕES E/OU CARCINOMA GÁSTRICO

A amostra foi constituída por 154 doentes diagnosticados com lesões e/ou adenocarcinoma gástrico seguidos no IPOP, EPE. As características clínicas destes estão descritas na tabela 3.

Tabela 3 - Caracterização dos doentes com lesões e/ou Carcinoma Gástrico

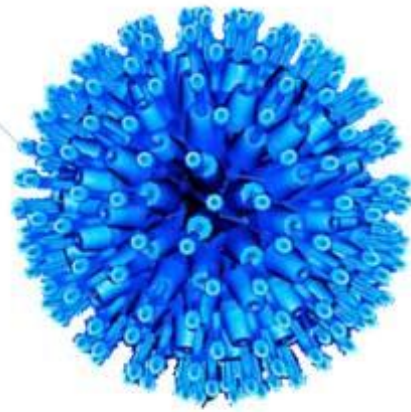
Género	n (%)
Feminino	72 (46,8 %)
Masculino	82 (53,2 %)
Mediana da idade, anos (mínimo - máximo)	57 (27 - 78)

3.2 INDIVÍDUOS SAUDÁVEIS

Os controlos foram constituídos por 305 dadores de sangue escolhidos de forma aleatória, que realizaram colheita de sangue no IPOP, EPE. As características de género e idade dos indivíduos saudáveis encontram-se descritas na tabela 4.

Tabela 4 - Caracterização dos indivíduos saudáveis

Género	n (%)
Feminino	152 (49,8 %)
Masculino	153 (50,2 %)
Mediana da idade, anos (mínimo - máximo)	40 (18 - 64)



IV. MÉTODOS

1. PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS

Para este estudo, cerca de 8 ml de sangue periférico foram colhidos por via intravenosa em tubos contendo EDTA. De seguida, procedeu-se a uma centrifugação com 2500 rotações por minuto (rpm) durante 10 minutos para separar o plasma da amostra. Após a centrifugação o plasma foi armazenado a -80 °C e o restante sangue aliquoteado para extracção de DNA.

2. EXTRACÇÃO DNA

O DNA foi isolado a partir de células nucleadas do sangue, pela técnica de *salting-out*-clorofórmio modificado (Müllenbach *et al.*, 1989). Para tal, foi adicionada uma solução hipotónica, o AKE, a todas as amostras de modo a provocar lise dos eritrócitos, sucedendo-se uma incubação durante 30 minutos a 4 °C. Seguidamente, centrifugou-se a 2500 rpm, durante 10 minutos a 4°C e ressuspendeu-se o sedimento na solução hipotónica, seguindo-se nova centrifugação a 2500 rpm (durante 10 minutos a 4°C). O “pellet” resultante foi ressuspendido em PBS, e seguiu-se nova centrifugação a 2500 rpm, durante 10 minutos a 4°C.

Após a obtenção do “pellet” de células nucleadas, este foi ressuspendido em 4 ml de tampão SE provocando a lise celular.

Adicionou-se SDS para promover a dissociação entre o DNA e as proteínas e, seguidamente, adicionou-se proteinase K a uma concentração final de 200 µg/ml e incubaram-se as amostras a 55°C durante 12 horas para completa degradação proteica.

Posteriormente, adicionou-se 1 ml de NaCl 6 M (a uma concentração final de 1,5 M), previamente aquecido, para precipitar as proteínas (“salting-out”). A separação das proteínas foi realizada através da adição de igual volume de clorofórmio e agitação suave durante 30 a 60 minutos. Seguiu-se uma centrifugação a 2500 rpm, durante 10 minutos a 4°C, de modo a separar a fase aquosa (que contém o DNA) da fase orgânica (que contém as proteínas degradadas). Recolheu-se a fase aquosa e adicionou-se igual volume de isopropanol promovendo, assim, a precipitação do DNA.

O DNA precipitado no passo anterior foi recolhido e lavado com etanol a 70%. Após a evaporação deste, o DNA foi ressuspenso em água bidestilada estéril e armazenado a 4°C ou a – 80°C de acordo com o tempo previsto até à sua utilização.

3. DETECÇÃO MOLECULAR DO EBV

A detecção de EBV foi efectuada através da amplificação de um fragmento da região *Bam W1* do EBV, com recurso a um protocolo de *Nested-Polymerase Chain Reaction* (*Nested-PCR*) cedido pelo Professor Paul J. Farrell do *Dept. of Virology do Imperial College Faculty of Medicine* de Londres, utilizando os *primers* EBV20A (5'-GCTAGGCCACCTTCTCAG-3') e EBV20B (5'-GTCCAGGGCCTTCACTTC-3') para o primeiro PCR; e os *primers* EBV20C (5'-TCTCCCCTAGGCTTGGAT-3') e EBV20D (5'-CCAGCGCGTTTACGTAAG-3') para o segundo PCR.

Em ambas as reacções de *PCR* a mistura da reacção foi efectuada numa solução com volume total de 50 μ L com: 1x *Taq buffer*, 2.5 mM $MgCl_2$, 0.2 mM DNTPs, 0.25 μ M de cada *primer*, 1U de *Taq DNA Polimerase* e 2 μ L DNA da amostra. A amplificação foi feita através das seguintes condições: desnaturação inicial a 95°C durante 5 minutos; 30 ciclos de desnaturação (1 minuto a 94 °C), seguida de emparelhamento dos *primers* (45 segundos a 51°C) e extensão (1 minuto a 72 °C); e um passo de extensão final - 7 minutos a 72°C.

Após a amplificação dos fragmentos de DNA, 320pb no primeiro *PCR* e 280pb no segundo *PCR*, procedeu-se à sua identificação. Para tal 15 μ l do produto de PCR foram analisados através de uma electroforese, em gel de agarose 1.5% corado com brometo de etídeo, que permitiu a visualização das bandas de DNA quando iluminadas com radiação UV (Figura 6).

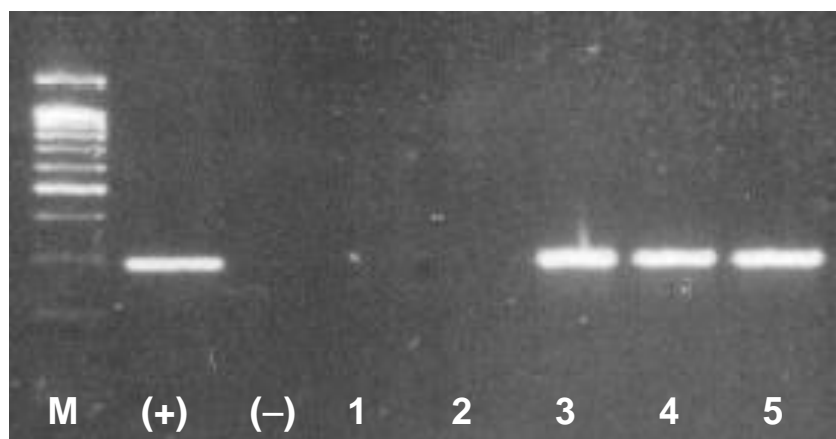


Figura 6 - Detecção dos produtos da região *BAM H1W* do EBV através de um *Nested-PCR*: M, Marcador de 100bp; (+), controlo positivo; (-), controlo negativo; 1 e 2, casos EBV negativo; 3 a 5, casos EBV positivo (280 pb).

4. DETECÇÃO SEROLÓGICA DO EBV

A detecção serológica do EBV foi realizada a partir da detecção de 4 anticorpos: IgG Anti-VCA, IgM Anti-VCA, IgG anti-EA e IgG anti-EBNA. Para detecção de IgG e IgM anti-VCA foi usada a técnica quantitativa clássica de ELISA, enquanto que para a IgG Anti-EA e EBNA foi usado o método qualitativo de imunofluorescência indirecto (IFA).

4.1 DETECÇÃO EBV IGG ANTI-VCA E EBV IGM ANTI-VCA (ELISA)

Para a confirmação dos anticorpos humanos IgG anti-VCA e IgM anti-VCA no soro recorreu-se ao uso de kits comerciais SERION ELISA *classic* Epstein-Barr Vírus VCA IgG/IgM. Usou-se um volume 10 µl de cada amostra para a detecção de cada anticorpo.

O SERION ELISA *classic* baseia-se no princípio da técnica ELISA indirecta. Nesta técnica as tiras de microtitulação são revestidas com o respectivo antigénio. Os anticorpos específicos presentes na amostra do doente ligam-se a estes antigénios imobilizados numa fase sólida. Para tornar visível a reacção serológica, são introduzidos anticorpos de confirmação marcados com fosfatase alcalina, específicos para as imunoglobulinas humanas da amostra do doente, ligadas ao antigénio, no caso positivo. Mediante a adição de substrato (para-nitrofenilfosfato) obtém-se uma reacção de enzima-substrato originando um produto final de coloração amarela. A intensidade da coloração amarela é medida por fotometria e é proporcional ao teor de anticorpos específicos.

4.2 DETECÇÃO DE EBV IGG ANTI-EA E EBV ANTI-EBNA (IFA)

Para a detecção dos anticorpos IgG anti-EA e anti-EBNA foram usados testes rápidos baseados na técnica imunofluorescência indirecta (IFA), o Merifluor® EBV-EA IgG IFA e o Merifluor® EBNA, respectivamente. Foram usados 20 µl de cada amostra para a detecção de cada anticorpo.

No método da imunofluorescência indirecta com anticorpo, o soro do doente reage com um substrato de células infectadas (antigénio específico fixado a lâminas). Caso estejam presentes os anticorpos IgG em pesquisa, estes vão ligar-se ao substrato, não sendo removidos por lavagem. Subsequentemente um o anticorpo anti-IgG, conjugado com fluoresceína, é adicionado ao local de reacção ligando-se aos anticorpos IgG em pesquisa, criando-se um complexo fluorescente, visível ao microscópio fluorescente (Figura 7 e 8).

Os resultados obtidos a partir desta técnica foram analisados num microscópio de fluorescência, por um especialista.

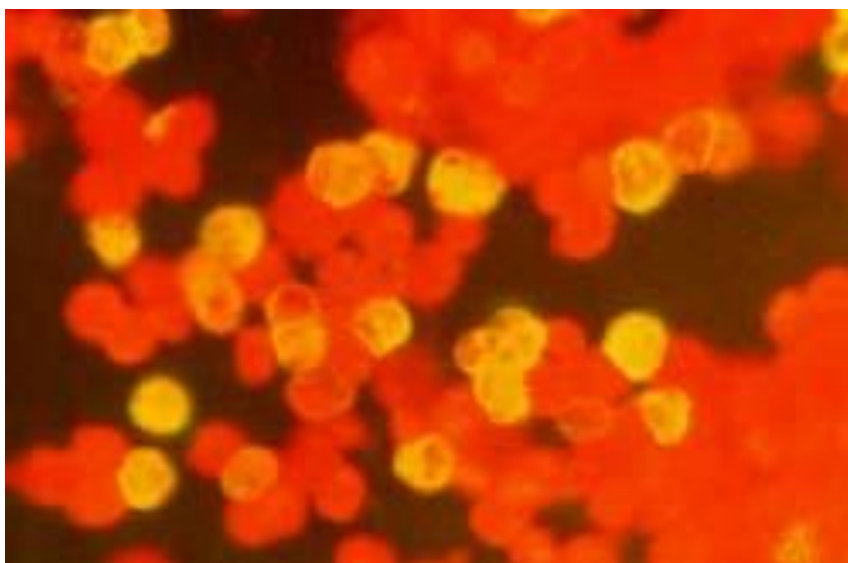


Figura 7 - Resultado positivo para EBV IgG Anti-EA por IFA

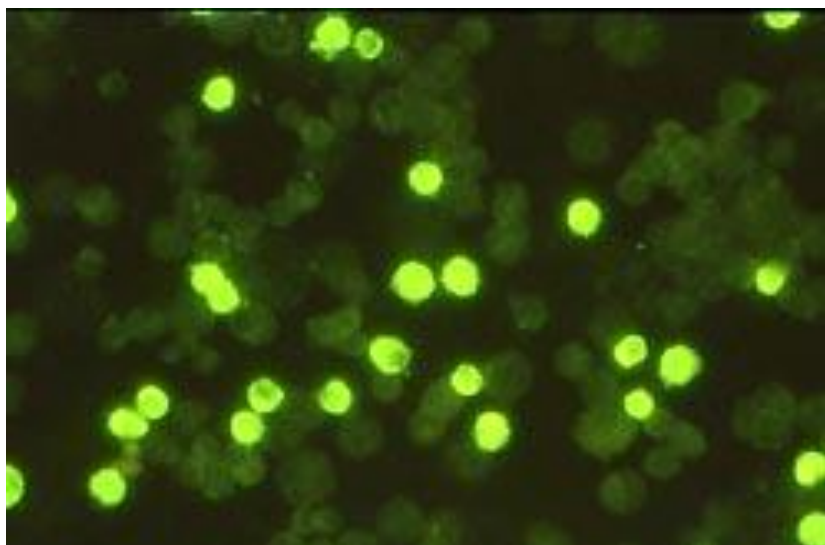


Figura 8 - Resultado positivo para EBV Anti-EBNA por IFA

5. VARIÁVEIS

No estudo foram contempladas variáveis primárias relacionadas com o status do vírus, tais como: presença do DNA do EBV e status serológico do EBV; e parâmetros clínico-patológicos para cada indivíduo incluído no estudo, tais como: idade, género, classificação clínica TNM e estadió clínico.

Foram ainda calculadas variáveis secundárias:

- **Grupos etários:** a partir da variável primária idade foram constituídos 4 grupos etários: ≤30 anos; 31-40 anos; 41-50 anos e ≥51 anos;
- **Estadio de acordo com classificação TNM:** a variável estadio foi estratificada através da classificação TNM e de acordo com a bibliografia consultada (Green FL *et al*, 2002) em: Estadio 0, Estadio IA, Estadio IB, Estadio II, Estadio IIIA, Estadio IIIB e Estadio IV;
- **Sem infecção:** define-se como a ausência de anticorpos contra os antígenos virais do EBV;
- **Infecção primária:** define-se como a infecção em que o anticorpo IgM para a cápside viral (VCA IgM) está presente e o anticorpo para o antígeno nuclear (anti-EBNA) está ausente. Um acréscimo ou altas concentrações do anticorpo IgG para a VCA (VCA IgG) e a negatização do anti-EBNA após, pelo menos, 4 semanas do início da doença é altamente sugestivo deste tipo de infecção. Cerca de 80% dos doentes com infecção activa por EBV produz anticorpos para o antígeno *early* (anti-EA);
- **Infecção Passada:** define-se como a infecção em que o VCA IgG e o anti-EBNA estão ausentes;
- **Re-infecção:** define-se como a infecção em que tanto o VCA IgG como o anti-EBNA estão presentes, bem como, uma elevação da concentração do anti-EA.

Tabela 5 - Quadro resumo da classificação serológica da infecção por EBV

	VCA IgG	VCA IgM	EBNA	EA
Sem infecção	-	-	-	-
Infecção primária	+	+	-	+/-
Infecção Passada	+	-	+	-
Re-infecção (Portador)	+	-	+	+/-

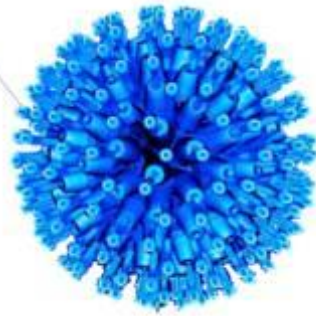
- **Tempo de sobrevida:** corresponde ao período de tempo que decorre desde o tratamento cirúrgico até ao dia da última data do último contacto hospitalar efectuado. No caso de ocorrer uma morte, o tempo de sobrevida é definido como o tempo que decorre desde o tratamento cirúrgico até ao dia da morte.
- **Tempo até progressão:** corresponde ao período de tempo que decorre desde o dia de definição do estadio inicial até ao dia que se define um estadio superior ao inicialmente definido.

6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram analisados estatisticamente com recurso ao programa *Statistical Package for Social Sciences for Mac V16.0*, (SPSS V16.0) sendo calculado o valor de *Odds Ratio* (OR), com um grau de confiança de 95% (IC95%), na análise dos parâmetros clinico-patológicos.

A análise da sobrevida e da progressão associada à presença de EBV em circulação foi realizada pelo método de Kaplan-Meier. O método Kaplan-Meier é um método estatístico não paramétrico que permite estimar o tempo e a probabilidade de sobrevida. Neste método, o tempo de seguimento de um grupo de indivíduos é dividido em intervalos, cujos limites correspondem ao período de tempo em que ocorreram determinados eventos. Assim, para a realização desta análise, torna-se necessário definir a data de início do seguimento, a data de fim do seguimento e o evento ocorrido. No presente estudo, em relação à sobrevida, a data de início do seguimento corresponde à data do tratamento, a data de fim de seguimento corresponde à data do último contacto hospitalar efectuado ou data da morte. No âmbito da progressão da doença, a data de início do seguimento corresponde à data da definição do estadio inicial, a data de fim de seguimento corresponde à data da definição de um estadio superior ao inicialmente definido, sendo o evento tido em consideração o agravamento do estadio.

V. RESULTADOS



1. CARACTERIZAÇÃO DA FREQUÊNCIA DE EBV

1.1 EBV EM INDIVÍDUOS SAUDÁVEIS

As frequências moleculares de EBV nas amostras dos indivíduos saudáveis, considerando os parâmetros clínico-patológicos, estão descritas na Tabela 6.

Foi possível identificar a presença de EBV em circulação em indivíduos saudáveis dadores de sangue em 32.1% (n=98) dos 305 casos analisados, incluindo 26.3% (n=40) de 152 mulheres e 37.9% (n=58) de 153 homens. Entre os diferentes grupos etários identificou-se a presença de EBV de forma semelhante, sendo que o grupo de 41 a 50 anos apresenta a menor frequência, 28,0% (n=21), e o grupo de ≥ 51 anos ostenta a maior frequência, 36,8% (n=28). A análise estatística dos dados obtidos nos indivíduos saudáveis revelou associações estatisticamente significativas, com um grau de confiança 95%, entre homem e mulher com um OR de 1.70 ($P=0.030$, IC95% = 1.05 – 2.78).

Tabela 6 - Frequência de EBV nos indivíduos saudáveis

		N	EBV – (%)	EBV + (%)	P	OR	IC 95%
Género	Feminino	152	112 (73,7%)	40 (26,3%)	0.030	1.70	(1,05 – 2,78)
	Masculino	153	95 (62,1%)	58 (37,9%)			
Grupos etários							
≤30 anos	Feminino	48	38 (79,2%)	10 (20,8%)	>0.050		
	Masculino	36	22 (61,1%)	14 (38,9%)			
	Total	84	60 (71,4%)	24 (28,6%)			
31-40 anos	Feminino	31	23 (74,2%)	8 (25,2%)	>0.050		
	Masculino	39	22 (56,4%)	17 (43,6%)			
	Total	70	45 (64,3%)	25 (35,7%)			
41-50 anos	Feminino	41	28 (68,3%)	13 (31,7%)	>0.050		
	Masculino	34	26 (76,5%)	8 (23,5%)			
	Total	75	54 (72,0%)	21 (28,0%)			
≥51 anos	Feminino	32	23 (71,9%)	9 (28,1%)	>0.050		
	Masculino	44	25 (56,8%)	19 (43,2%)			
	Total	76	48 (63,2%)	28 (36,8%)			

OR - Odds Ratio; P – Coeficiente de Pearson; CI – Intervalo de confiança

1.2 EBV EM DOENTES COM LESÕES E/OU ADENOCARCINOMA GÁSTRICO

Foi analisada a presença de EBV em circulação em 154 indivíduos com lesões gástricas (Tabela 7) estando presente em 40,9% (n=63), dos quais 22 eram mulheres (30,6% de 72) e 41 homens (50,0% de 82). Em relação à informação histológica dos casos, observaram-se 14 casos EBV positivos (35,0% de 40) no grupo de *Associated Diseases to Gastric Adenocarcinoma* (ALGA); 22 (44,9% de 49) entre o grupo dos

Adenocarcinomas Gástricos tipo intestinal (AdCG- Intestinal) e 10 casos EBV positivo (38,5% de 26) entre o grupo dos Adenocarcinomas Gástricos tipo difuso (AdCG- Difuso).

Tabela 7 - Frequência de EBV nos doentes com lesões e/ou adenocarcinoma gástrico

		n	EBV – (%)	EBV + (%)
Género	Feminino	72	50 (69,4%)	22 (30,6%)
	Masculino	82	41 (50,0%)	41 (50,0%)
Histologia				
ALGA	Feminino	24	19 (79,2%)	5 (20,8%)
	Masculino	16	7 (43,8%)	9 (56,3%)
	Total	40	26 (65,0%)	14 (35,0%)
AdCG - Intestinal	Feminino	17	11 (64,7%)	6 (35,3%)
	Masculino	32	16 (50,0%)	16 (50,0%)
	Total	49	27 (55,1%)	22 (44,9%)
AdCG - Difuso	Feminino	16	10 (62,5%)	6 (37,5%)
	Masculino	10	6 (60,0%)	4 (40,0%)
	Total	26	16 (61,5%)	10 (38,5%)

ALGA – Associated Lesions to Gastric Adenocarcinoma; **AdCG** – Adenocarcinoma Gástrico; OR - Odds Ratio; P – Coeficiente de Pearson; CI – Confidence Interval

Realizaram-se análises estatísticas dos dados obtidos nos doentes com lesões e/ou carcinoma gástrico correlacionando a presença de EBV (no geral e entre os géneros) entre os diferentes tipos histológicos e entre estes e os dados dos indivíduos saudáveis. Estas análises estatísticas não revelaram qualquer associação estatisticamente significativa num grau de confiança de 95%. Porém, foi revelada uma ligeira tendência de associação entre os indivíduos saudáveis e os doentes com lesões e/ou carcinoma gástrico (OR= 1.46, $P=0.063$, IC95% = 0,98 – 2,78) e entre os primeiros e os doentes com AdCG – intestinal (OR= 1.72, $P=0.080$, IC95% = 0,93 – 3,17) (Tabela 8).

Tabela 8 - Análise estatística da presença do EBV entre os diferentes tipos histológicos

		P	OR	IC 95%
Indivíduos Saudáveis	AdCG – Geral	0,063	1,46	(0,98 – 2,18)
	ALGA	0,716		
	AdCG – Intestinal	0,080	1,72	(0,93 – 3,17)
	AdCG – Difuso	0,509		
ALGA	AdCG – Intestinal	0,344		

ALGA – Associated Lesions to Gastric Adenocarcinoma; **AdCG** – Adenocarcinoma Gástrico; OR - Odds Ratio; P – Coeficiente de Pearson; CI – Confidence Interval

2. ANÁLISE DA INFECÇÃO POR EBV EM DOENTES COM ADENOCARCINOMA GÁSTRICO DO TIPO INTESTINAL

2.1 CARACTERIZAÇÃO DA INFECÇÃO POR EBV

Nos doentes com AdCG – intestinal procedeu-se, também, à análise serológica do tipo de infecção por EBV. Dos quatro tipos de infecção existentes por EBV foram observados apenas dois tipos: 14 casos (28,6%) de infecção passada e 32 casos (65,3%) de re - infecção (portador), sendo que em 3 casos (6,1%) não foi possível determinar o tipo de infecção (Figura 9).

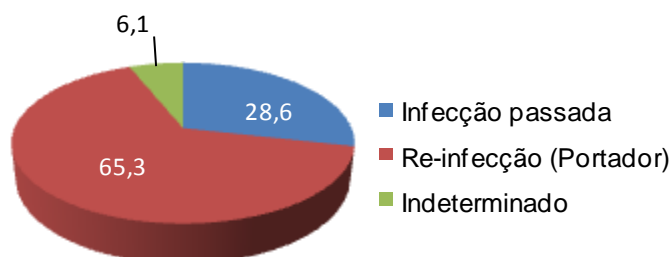


Figura 9 - Frequência dos tipos de infecção por EBV

2.2 CARACTERIZAÇÃO DA PRESENÇA DE EBV CIRCULANTE

Identificou-se a presença de EBV em circulação em 6 casos (42,9% de 14) de infecção passada por EBV e em 15 casos (46,9% de 32) de re-infecção por EBV (Tabela 9).

Tabela 9 - Presença de EBV em função do tipo de infecção

	N	EBV – (%)	EBV + (%)
	49	27 (55,1%)	22 (44,9%)
Tipo de Infecção			
Sem infecção	0	--	--
Infecção primária	0	--	--
Infecção Passada	14	8 (57,1%)	6 (42,9%)
Re-infecção (Portador)	32	17 (53,1%)	15 (46,9%)
Indeterminado	3	2 (66,7%)	1 (33,3%)

Na tabela 10 descrevem-se as frequências da presença de EBV em circulação no grupo de doentes com AdCG – intestinal de acordo com a classificação TNM e estadió clínico.

Tabela 10 - Presença de EBV em função da classificação TNM e estadio clínico

		n	EBV – (%)	EBV + (%)
Classificação TNM				
T	Tx	10	3 (30%)	7 (70%)
	T1	1	1 (100%)	0
	T2	4	2 (50,0%)	2 (50,0%)
	T3	25	16 (64,0%)	9 (36,0%)
	T4	8	5 (62,5%)	3 (37,5%)
	Total	48	27 (56,2%)	21 (43,8)
N	N0	4	2 (50,0%)	2 (50,0%)
	N1	13	10 (77,0%)	3 (23,0%)
	N2	11	7 (64,0%)	4 (36,0%)
	N3	5	1 (20,0%)	4 (80,0%)
	Total	33	20 (61%)	13 (39%)
M	M0	25	16 (64,0%)	9 (36,0%)
	M1	22	10 (45,5%)	12 (54,5%)
	Total	47	26 (55%)	21 (45%)
Estadio				
	IA	0	--	--
	IB	1	1 (100%)	0
	II	6	4 (66,7%)	2 (33,3%)
	IIIA	6	5 (83,3%)	1 (16,7%)
	IIIB	6	3 (50,0%)	3 (50,0%)
	IV	28	14 (50,0%)	14 (50,0%)
	Total	47	27 (57,4%)	20 (42,6%)

No contexto da extensão do tumor primário (T), a frequência da presença do EBV foi de 50% (n=2) para a avaliação T2, 36% (n=9) para a avaliação T3 e de 37,5% (n=3) para avaliação T4. Dos 49 casos disponíveis de AdCG – intestinal apenas foi disponibilizada informação relativa ao tumor primário para 48 casos, em 10 dos quais não foi possível a avaliação do tumor primário (Tx). Apenas em 33, de entre os 48 casos, se teve disponível a informação da invasão ganglionar regional (N). A presença de EBV foi observada em 2 casos (50,0%) com avaliação N0, em 3 casos (23,0%) para a N1 e 4 casos para ambas avaliações N3 e N4 (36,0% e 80% respectivamente).

Dos 47 casos com informação sobre metastização à distância (M) identificou-se a presença de EBV em 36% (n=9) dos casos com ausência de metastização à distância (M0) e em 54,5% (n=12) dos casos com metastização à distância.

No âmbito do estadiamento clínico observou-se uma maior presença de EBV em circulação nos estadios mais avançados (IIIB e IV), tendo ambos uma frequência de 50% ($n=3$ e $n=14$ respectivamente). Nos restantes estadios identificou-se a presença de EBV em 1 caso (16,7%) no estadio IIIA, em 2 casos (33,3%) no estadio II e em nenhum caso no estadio IB.

Foram efectuadas análises estatísticas, com grau de confiança de 95%, correlacionando a presença de EBV entre as várias avaliações da classificação TNM e entre os vários estadios. Nestas análises, encontrou-se apenas uma associação estatisticamente significativa entre as avaliações $N \leq 2$ e $N3$ com um OR de 8,44 ($P=0.044$, IC95% = 0,82 – 86,83). Apesar de não ser estatisticamente significativa, entre os estadios \leq IIIA e \geq IIIB foi encontrada uma leve diferença (OR= 3,33, $P=0.095$, IC95% = 0,78 – 14,28).

2.3 ANÁLISE DA SOBREVIDA E TEMPO ATÉ PROGRESSÃO ASSOCIADA A EBV

Na análise da sobrevida associada à presença de EBV em circulação, apesar de não ser estatisticamente significativa, constatou-se que os doentes positivos para a presença de EBV apresentam um tempo médio de sobrevida global (30,86 meses) inferior ao dos doentes negativos para a presença de EBV (46,03 meses) de aproximadamente 16 meses (Tabela 11 e Figura 10A).

Tabela 11 - Tempo médio de sobrevida global e até progressão em função da presença de EBV

(meses \pm sd*)	
Tempo médio de sobrevida global em função da presença de EBV	
EBV +	30,86 \pm 7,85
EBV -	46,03 \pm 6,51
Tempo médio até progressão em função da presença de EBV	
EBV +	23,44 \pm 4,28
EBV -	33,29 \pm 5,31

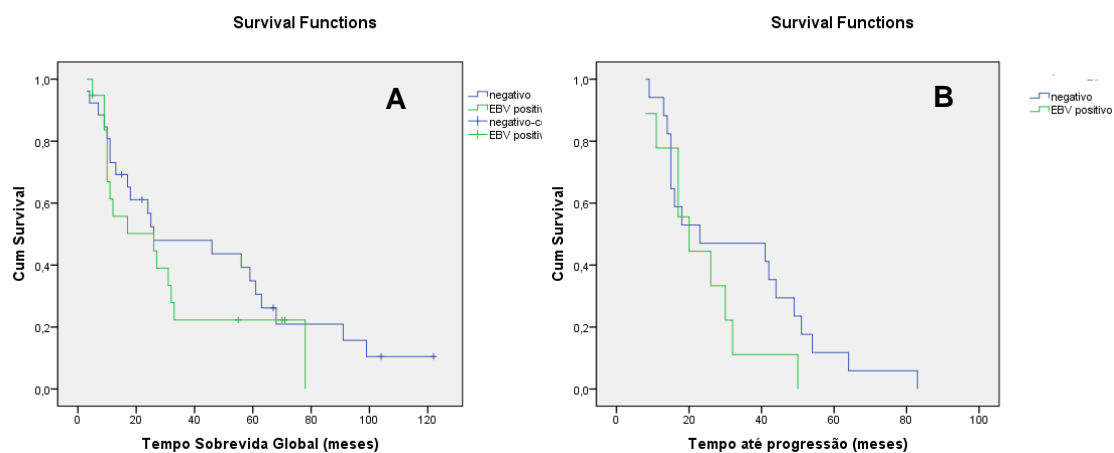
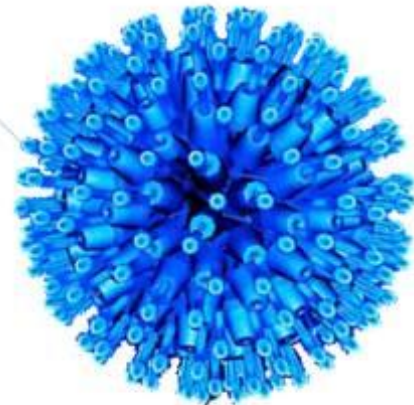
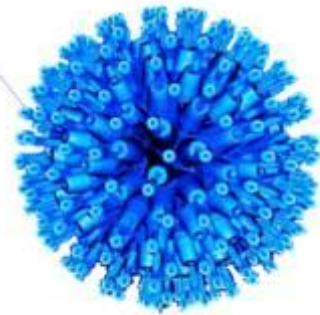


Figura 10 - Tempo médio de sobrevida global (A) e até progressão (B)

Na tabela 11 e na figura 10B está descrita a análise do tempo até progressão em função da presença de EBV em circulação. Nesta análise verificou-se uma diferença, não comprovada estatisticamente, do tempo médio até progressão entre os doentes EBV positivos (23,44 meses) e os doentes EBV negativos (33,29 meses), sendo que estes últimos possuem um tempo médio até progressão de aproximadamente 10 meses superior aos primeiros.



VI. DISCUSSÃO

Apesar de novas evidências continuarem a surgir, a associação do EBV na carcinogénese gástrica está ainda pouco estabelecida. Mais estudos serão ainda necessários de modo a caracterizar melhor esta associação e, naturalmente, dar respostas às dúvidas existentes.

Este estudo faz parte de um trabalho em desenvolvimento que pretende ser uma caracterização completa da associação entre o EBV e o carcinoma gástrico. Este estudo pretende contribuir para um melhor conhecimento da carcinogénese gástrica induzida pelo EBV. Para esse fim, realizou-se a caracterização molecular da presença de EBV em circulação em doentes diagnosticados com lesões e/ou carcinoma gástrico e sua comparação com indivíduos saudáveis e também a caracterização serológica do tipo histológico mais associado ao EBV, o adenocarcinoma gástrico tipo intestinal (AdCG – intestinal).

Sendo um estudo de caracterização parcial, apresentou como grande limitação o facto de apenas podermos realizar uma caracterização do EBV ao nível circulatório, não sendo possível estabelecer uma relação causal por não termos dados histológicos dos tecidos. Outras das limitações do estudo foi a indisponibilidade de informação clínico-patológica de alguns doentes, o que reduziu o número da amostra, já de si escassa.

Deste estudo são muitos os dados que podem ser interpretados com alguma importância. Desde já, o facto de se observar uma maior presença de EBV em indivíduos do sexo masculino do que nas mulheres. De facto, não existem dados epidemiológicos nem factos científicos que possam justificar este resultado, no entanto poderá dever-se a diferentes comportamentos sócio-culturais que podem predispor o homem a um maior risco. Estes resultados estão de acordo com os observados, histologicamente, noutros estudos já publicados em populações do Japão e da África do Sul (Morie *et al*, 2006; Villiers *et al*, 2006).

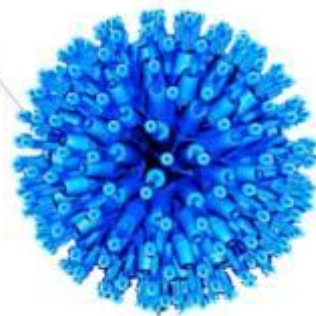
A análise comparativa da frequência de EBV em circulação entre indivíduos saudáveis e doentes com lesões e /ou carcinoma gástrico, revelou não existirem diferenças estatisticamente significativas. Porém, registaram-se indícios de um ligeiro risco acrescido para EBV em circulação para doentes com lesões e/ou carcinoma gástrico e doentes com AdCG - intestinal quando comparados com indivíduos saudáveis. Devido a estarem no limiar da comprovação estatística, estes resultados indicam que será necessário um estudo futuro com maior número de casos para averiguar se existe ou não uma associação. Observámos ainda que parece não existir risco de progressão entre as lesões precursoras (ALGA) e carcinoma gástrico (AdCG-Geral) associado à infecção por EBV. Este dado é contrário àquele que seria esperado, pois é sugerido que a infecção viral por EBV é um evento relativamente tardio na carcinogénese gástrica (Young *et al*, 2004).

A caracterização serológica dos indivíduos com AdCG – intestinal revelou que o pressuposto de que mais de 90% da população mundial está ou já esteve em contacto com o EBV (Young *et al*, 2004) poderá ser correcto. Neste estudo, verificou-se que 46 dos 49 indivíduos tinham estado em contacto com EBV ou estavam com uma infecção actualmente, sendo importante realçar que 65,3 % apresentam uma reactivação da infecção por EBV (Re-infecção). Estes resultados são claramente difíceis de explicar, pois uma vez que foram obtidos em amostras prévias a qualquer tratamento poderão indicar: 1) que o EBV poderá estar associado ao tumor porque este tipo infecção é característica das patologias em que o EBV é o agente etiológico, o Linfoma de *Burkitt* e o carcinoma da nasofaringe (Sumaya CV, 1985); 2) que a sua activação pode ser induzida pelo tumor; ou 3) porque a maioria dos doentes aparece em estádios mais avançados, a regulação imunológica é menor e assim temos reactivação do EBV.

A presença de EBV circulante nos doentes com AdCG - intestinal com re-infecção foi ligeiramente superior aos doentes com AdCG - intestinal com infecção passada (46,9% e 42,9% respectivamente). Estes resultados estão de acordo com o que seria lógico esperar, uma vez que na re-infecção existe a reactivação do vírus e este estaria mais disponível em circulação.

No presente estudo foi possível observar que o risco para doentes com AdCG - intestinal com envolvimento nodular disseminada intra-abdominal (N3) é muito superior ao dos doentes sem envolvimento ou com envolvimento nodular não disseminada (N0; N1 e N2) (OR=8.44). A imunossupressão dos doentes pode justificar estes resultados, pois os carcinomas gástricos quando associados ao EBV (EBVaGC) estão normalmente ligados a bom prognóstico (Selgrad, M. *et al*, 2008; Maeda E *et al*, 2008). Outros resultados observados, apesar de não comprovados estatisticamente, que poderão fortalecer este pressuposto é o risco acrescido de presença de EBV nos dois estádios superiores (IIIB e IV), bem como a sua associação a uma menor sobrevida global e menor tempo até progressão.

VII. CONCLUSÃO



O carcinoma gástrico (CG) é um grande problema de saúde pública a nível mundial e a segunda causa mais comum de mortalidade relacionada com o cancro (Ferlay J *et al*, 2004).

O EBV é uma co-infecção comum a várias doenças e alguns autores sugerem que ele pode representar um evento tardio no processo de carcinogénese do CG, após a infecção por *Helicobacter pylori*. Apesar da existência de plausibilidade biológica, ainda há falta de informação clara sobre o papel do EBV no CG. No mundo são estimados 50000 casos por ano de CG positivos para EBV, porém permanece a dúvida se esta positividade é uma causa ou uma consequência (Sousa H. *et al*, 2008).

Apesar de alguns dos resultados não serem estatisticamente significativos, este estudo aponta um vasto conjunto de dados que devem ser considerados para estudos futuros e que demonstram grande importância na área:

- 1) A frequência de EBV circulante em 32% da população saudável, principalmente em indivíduos do sexo masculino;
- 2) Frequência de EBV circulante em indivíduos com ALGA de 35%;
- 3) Frequência de EBV circulante em indivíduos com AdCG-difuso de 39%;
- 4) Frequência de EBV circulante em indivíduos com AdCG-intestinal de 45%;
- 5) 65% dos indivíduos com AdCG-intestinal tem reactivação da infecção por EBV;
- 6) Aumento da frequência de EBV com os parâmetros clínico patológicos;
- 7) Associação com menor sobrevida global e menor tempo até progressão.

Este estudo faz parte de um trabalho em desenvolvimento que visa a caracterização completa do EBV no CG e, assim, pretende ajudar a responder a algumas dúvidas que ainda permanecem sobre o papel do EBV na carcinogénese do CG. No âmbito desse projecto, este estudo desempenhou uma parte fulcral na caracterização inicial e na definição da estratégia para obter os melhores resultados. De futuro, pretende-se a realização de outros estudos parciais que no seu conjunto irão completar a caracterização do papel do EBV no CG, bem como ajudar a encontrar factores preditivos e de prognóstico, de modo a facilitar a prevenção e as decisões terapêuticas nos EBVaGC.



VIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS



- Bartel DP (2004) MicroRNAs: Genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*. 116:281–97.
- Baumforth KR, Young LS, Flavell KJ, Constandinou C, and Murray PG (1999) The Epstein-Barr virus and its association with human cancers. *Mol Pathol*. 52 [6]:307-22
- Binne UK, Amon W, and Farrell PJ (2002) Promoter sequences required for reactivation of Epstein-Barr virus from latency. *J Virol*. 76 [20]:10282-9
- Burkitt D (1958) A sarcoma involving the jaws in African children. *Br J Surg*. 46 [197]:218-23
- Burkitt D (1962) Determining the climatic limitations of a children's cancer common in Africa. *Br Med J*. 5311:1019-23
- Callan MF (2004) The immune response to Epstein-Barr virus. *Microbes Infect*. 6 [10]:937-45
- Capasso LL (2005) Antiquity of cancer. *Int J Cancer*. 113 [1]:2-13
- Correa, P (1985) Clinical implications of recent developments in gastric cancer pathology and epidemiology. *Semin. Oncol*. 12:2–10.
- Cuello C, Lopez J, Correa P, Murray J, Zarama G, Gordillo G (1979) Histopathology of gastric dysplasias: Correlations with gastric juice chemistry. *Am J Surg Pathol* 3:491–500.
- de Martel C, Franceschi S.v (2009) Infections and cancer: established associations and new hypotheses. *Crit Rev Oncol Hematol*. 70 [3]:183-94
- DeVita VT Jr., Hellman S. Rosenberg SA (2001). Cancer - Principals & Practice of Oncology. 6 th Edition. Lippincott Williams & Wilkins.
- Epstein MA, Achong BG, and Barr YM (1964) Virus particles in cultured lymphoblasts from Burkitt's Lymphoma. *Lancet*. 15 :702-3
- Farrell PJ (2002) Tumour viruses--could they be an Achilles' heel of cancer? *Eur J Cancer*. 38 [14]:1815-6
- Faulkner GC, Krajewski AS, Crawford DH (2000) The ins and outs of EBV infection. *Trends Microbiol*. 8 [4]:185-9
- Ferlay J, Bray F, Pisani P, Parkin DM (2004). Globocan 2002: Cancer incidence, mortality and prevalence worldwide. IARC Cancerbase No.5. V. 2.0, IARCPress. Disponível em: www.depdb.iarc.fr/globocan/GLOBOframe.html
- Fox JG, Wang TC (2007) Inflammation, atrophy, and gastric cancer. *J Clin Invest*. 117 [1]:60-9.
- Fukayama M, Hino R, Uozaki H (2008) Epstein-Barr virus and gastric carcinoma: virus-host interactions leading to carcinoma. *Cancer Sci*. 99 [9]:1726-33.
- Green FL, Page DL, Fleming ID, et al. (2002). AJCC cancer staging manual.6th edition New York: Springer.
- Hantz O, Vitvitski L, Pichoud C, and Trepo C (1979) Identification of a virus similar to hepatitis B virus in non-A non-B hepatitis. *C R Seances Acad Sci D*. 289 [16]:1263-6
- Henle G, Henle W, Diehl V (1968) Relation of Burkitt's tumorassociated herpes-type virus to infectious mononucleosis. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 59: 94–101
- Duarte GIS (2005) Polimorfismo no Promotor do Gene TNF-alpha e Risco para Cancro do Colo Uterino. Tese de Mestrado em Oncologia. Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar - Universidade do Porto.

- Kim DN, Chae HS, Oh ST *et al* (2007) Expression of viral microRNAs in Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma. *J Virol.* 81:1033–6.
- Klein E (1998) The complexity of the Epstein-Barr virus infection in humans. *Pathol Oncol Res.* 4 [1]:3-7
- Kuppers R (2003) B cells under influence: transformation of B cells by Epstein-Barr virus. *Nat Rev Immunol.* 3 [10]:801-12
- Kuppers R (2003) B cells under influence: transformation of B cells by Epstein-Barr virus. *Nat Rev Immunol.* 3 [10]:801-12
- Kutok JL, Wang F (2006) Spectrum of Epstein-Barr virus-associated diseases. *Annu Rev Pathol.* 1 :375-404
- Lauren P. (1965) The two histological main types of gastric carcinoma: diffuse and so-called intestinal-type carcinoma. An attempt at a histo-clinical classification. *Acta Pathol Microbiol Scand.* 64:31-49.
- Levitsky V, Masucci MG (2002) Manipulation of immune responses by Epstein- Barr virus. *Virus Res.* 88 [1-2]:71-86
- Lewin B (2004) *Genes VIII.* 1st edition. Pearson Prentice Hall, New Jersey.
- Liebowitz D (1995) Epstein-Barr virus--an old dog with new tricks. *N Engl J Med.* 332 [1]:55-7
- Linde A (1996) Diagnosis of Epstein-Barr virus-related diseases. *Scand. J. Infect. Dis.* 28 [10]: 83–88
- Liotta LA, Liu ET (2001). Essentials of Molecular Biology: Genomics and Cancer. In *Cancer: Principles and practice of oncology*, 6th edition (eds DeVita VT, Hellman S, Rosenberg SA); Lippincott Williams and Williams, USA, pág. 17.
- Lo YM, Chan LY, Lo KW, Leung SF, Zhang J, Chan AT, *et al* (2009) Quantitative analysis of cell-free Epstein-Barr virus DNA in plasma of patients with nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Res.* 59 [6]:1188-91.
- Lopes V, Young LS, Murray PG (2003) Epstein-Barr virus-associated cancers: aetiology and treatment. *Herpes.* 10 [3]:78-82
- Maeda E, Akahane M, Uozaki H, Kato N, Hayashi N, Fukayama M, Ohtomo K (2009) CT appearance of Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma. *Abdom Imaging.* 34 [5]:618-25.
- Michor F, Iwasa Y, Nowak MA (2004) Dynamics of cancer progression. *Nat Ver Cancer.* 4 [3]:197-205
- Murray PG, Young LS (2001) Epstein-Barr virus infection: basis of malignancy and potential for therapy. *Expert Rev Mol Med.* 15:1-20
- Oda, K., Tamaru, J., Takenouchi, T., Mikata, A., Nunomura, M., aito, N., *et al* (1993) Association of Epstein-Barr virus with gastric carcinoma with lymphoid stroma. *Am. J. Pathol.*, 143: 1063–71
- Ohga S, Nomura A, Takada H, Hara T (2002) Immunological aspects of Epstein- Barr virus infection. *Crit Rev Oncol Hematol.* 44 [3]:203-15
- Pagano JS, Blaser M, Buendia MA, Damania B, Khalili K, Raab-Traub N, Roizman B (2004) Infectious agents and cancer: criteria for a causal relation. *Semin Cancer Biol.* 14 [6]:453-71
- Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P (2005) Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin.* 55:74–108.

- Parkin DM (2006) The global health burden of infection-associated cancers in the year 2002. *Int J Cancer*. 118:3030–44.
- Peek RM, Jr., Blaser MJ (2002) Helicobacter pylori and gastrointestinal tract adenocarcinomas. *Nat Rev Cancer*. 2:28–37.
- Pitot HC, Goldsworthy T, Moran S (1981) The natural history of carcinogenesis: Implications of experimental carcinogenesis in the genesis of human cancer. *J Supramol Struct Cell Biochem*, 17 [2]:133-46.
- Rickinson AB, Kieff E (2001). *Fields Virology*. 4th Edition. Knipe, D. M. and Howley, PM (eds). Lippincott Williams & Wilkins Publishers: Philadelphia, pp. 2575-2627.
- Rous P (1911) A sarcoma of the fowl transmissible by an agent separable from the tumour cells. *J Exp Med*. [13]:397
- Sample J, Young L, Martin B, Chatman T, Kieff E, Rickinson A, Kieff E (1990) Epstein-Barr virus types 1 and 2 differ in their EBNA-3A, EBNA-3B, and EBNA-3C genes. *J Virol*. 64 [9]:4084-92
- Schiffman MH, Bauer HM, Hoover RN, Glass AG, Cadell DM, Rush BB, Scott DR, Sherman ME, Kurman RJ *et al* (1993) Epidemiologic evidence showing that human papillomavirus infection causes most cervical intraepithelial neoplasia. *J Natl Cancer Inst*. 85 [12]:958-64
- Selgrad M, Malfertheiner P, Fini L, Goel A, Boland CR, Ricciardiello L (2008) The role of viral and bacterial pathogens in gastrointestinal cancer. *J Cell Physiol*. 216 [2]:378-88.
- Shibata D, Weiss LM (1992) Epstein-Barr virus-associated gastric adenocarcinoma. *Am J Pathol*. 140:769–774.
- Sitki-Green D, Covington M, Raab-Traub N (2003) Compartmentalization and transmission of multiple Epstein-Barr virus strains in asymptomatic carriers. *J Virol*. 77 [3]:1840-7.
- Sousa H, Pinto-Correia AL, Medeiros R, Dinis-Ribeiro M (2008) Epstein-Barr virus is associated with gastric carcinoma: the question is what is the significance? *World J Gastroenterol*. 14 [27]:4347-51.
- Sumaya CV (1985) Serological Testing for Epstein-Barr Virus: Developments in Interpretation. *J Infect Dis*. 151 [6]:984-7.
- Thompson MP and Kurzrock R (2004) Epstein-Barr virus and cancer. *Clin Cancer Res*. 10 [3]:803-21
- Uozaki H, Fukayama M (2008) Epstein-Barr Virus and Gastric Carcinoma - Viral Carcinogenesis through Epigenetic Mechanisms. *Int J Clin Exp Pathol*. 1 [3]:198-216.
- Vogelstein B, Kinzler KW (1998) *The Genetic Basis of Human Cancer*. McGraw-Hill, New York
- Wu, MS, Shun, CT, Wu, CC, Hsu, TY, Lin, MT, Chang, MC, *et al* (2000) Epstein-Barr virus-associated gastric carcinomas: relation to *H. pylori* infection and genetic alterations. *Gastroenterology*. 118:1031–38
- Young LS, Clark D, Sixbey JW, Rickinson AB (1986) Epstein-Barr virus receptors on human pharyngeal epithelia. *Lancet*. 1 [8475]:240-2
- Young LS, Dawson CW, Eliopoulos AG (2000) The expression and function of Epstein-Barr virus encoded latent genes. *Mol Pathol*. 53 [5]:238-47
- Young LS, Murray PG (2003) Epstein-Barr virus and oncogenesis: from latent genes to tumours. *Oncogene*. 22 [33]:5108-21

- Young LS and Rickinson AB (2004) Epstein-Barr virus: 40 years on. *Nat Rev Cancer*. 4 [10]:757-68
- Zur Hausen A, van Rees BP, van Beek J, Craanen ME, Bloemena E, Offerhaus GJ, Meijer CJ, van den Brule AJ (2004) Epstein-Barr virus in gastric carcinomas and gastric stump carcinomas: a late event in gastric carcinogenesis. *J Clin Pathol*. 57 [5]:487-91

